

Aus dem Medizinischen Zentrum für
Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. J. A. Werner
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

**Klinisch-pathologische Untersuchungen von Patienten mit Sialadenose
der großen Kopfspeicheldrüsen unter Berücksichtigung einer
möglichen pathogenetischen Rolle von Aquaporin 5**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Martin Borkeloh
aus Bad Mergentheim

Marburg, 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am 15.04.2010

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: PD Dr. R. Mandic

1. Korreferent: PD Dr. E. Heinmöller

„Ich blicke zum Himmel und sehe, was deine Hände geschaffen haben;
den Mond und die Sterne – allen hast du ihre Bahn vorgezeichnet.
Wie klein ist da der Mensch! Und doch beachtest du ihn!“

Die Bibel: Psalm 8,4-5

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Speicheldrüsen im Kopf-Hals-Bereich	1
1.2	Sialadenosen	2
1.3	Aquaporine.....	3
1.4	Zielsetzung.....	4
2	MATERIAL UND PATIENTEN.....	5
2.1	Chemikalien	5
2.2	Puffer und Lösungen.....	6
2.3	Antikörper	7
2.4	Patientengewebe	7
2.5	Patientenkollektiv	7
2.6	Geräte	8
3	METHODEN.....	10
3.1	Morphometrie	10
3.2	Immunhistologische Nachweismethoden	10
3.2.1	Die Avidin-Biotin-Methode: Prinzip	11
3.2.2	Vorbereitung des Gewebes für die immunhistochemische Färbung	12
3.2.2.1	Organfixierung und Paraffineinbettung	12
3.2.2.2	Herstellung von Schnittpräparaten.....	13
3.2.2.3	Entparaffinierung und Rehydrierung	13
3.2.2.4	Inkubationsschema.....	13

3.2.3 Inkubation des Primär- und Sekundärantikörpers und Auftragung des Chromogens	13
3.2.4 Positiv- und Negativkontrollen	14
4 ERGEBNISSE	15
4.1 Immunhistochemische Färbungen von Aquaporinwasserkanälen.....	17
4.2 Morphometrische Untersuchungen	21
4.3 Klinische Kasuistiken	23
5 DISKUSSION	40
5.1 Sialadenose	40
5.2 Aquaporinwasserkanäle	43
5.3 Ätiopathologie von Sialadenosen	47
6 ZUSAMMENFASSUNG	53
7 LITERATURVERZEICHNIS	55
8 ANHANG	59
8.1 Abkürzungsverzeichnis.....	59
8.2 Abbildungsverzeichnis.....	60
8.3 Tabellenverzeichnis	62
8.4 Tabellarischer Lebenslauf	63
8.5 Verzeichnis der akademischen Lehrer	64
8.6 Vorträge und Publikationen	65
8.7 Danksagung	67
8.8 Ehrenwörtliche Erklärung	68

1 Einleitung

1.1 Speicheldrüsen im Kopf-Hals-Bereich

Die großen Speicheldrüsen des Kopf-Hals-Bereichs gehören neben der Bauchspeicheldrüse und der Leber zu den Anhangsdrüsen des Verdauungskanal und sind jeweils paarig angelegt. Die Glandula parotidea ist eine rein seröse, die Glandula submandibularis eine seromuköse mit überwiegend serösem Drüsenanteil und die Glandula sublingualis eine überwiegend muköse Drüse.

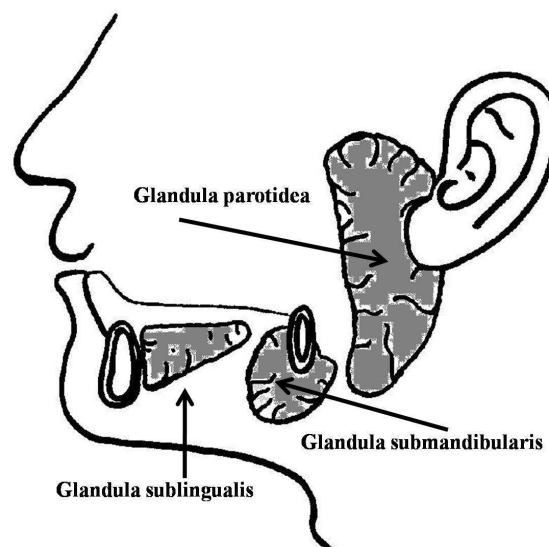


Abbildung 1. Übersicht über die Lokalisation der großen Speicheldrüsen im Kopf-Hals-Bereich (bearbeitet nach F.H. Netter, Atlas der Anatomie, 2000).

Zu ihren Hauptfunktionen zählen eine Mitbeteiligung an der Verdauung, z.B. die Aufspaltung von Stärkemolekülen durch α -Amylase, und eine Schutzfunktion für die Mundhöhle und den Rachenraum. Diese wird durch den ständigen Speichelfluss und durch im Speichel enthaltene antibakteriell wirksame Substanzen (unter anderem Lysozym, sekretorisches IgA und IgG, Lactoferrin) erfüllt. Insgesamt werden ca. 1,5 Liter Speichel pro Tag produziert. Der zunächst isoosmotische Speichel wird auf seinem Transport durch die Ausführungsgänge im Wesentlichen durch die Streifenstücke bezüglich der Elektrolytzusammensetzung modifiziert und durch Sekretion von Bikarbonat alkalisiert.

1.2 Sialadenosen

Neben Tumoren und entzündlichen Erkrankungen zählen Sialadenosen zu den dritthäufigsten Erkrankungen (ca. 10%) der großen Speicheldrüsen [Donath, 1979]. Von der WHO werden sie neben Zysten, gutartig lymphoepithelialen Veränderungen, einer Onkozytose oder dem Küttner Tumor zu den tumorähnlichen Erkrankungen der großen Speicheldrüsen gerechnet. Die Sialadenose oder Sialose ist definiert als eine nicht entzündliche, nicht neoplastische, weiche, häufig schmerzlose und in der Regel beidseitige Schwellung der großen Kopfspeicheldrüsen - meist der Glandula parotidea. Sie kann periodisch auftreten [Seifert, 1996]. Die Erkrankung ist nicht geschlechtsspezifisch und tritt meist nach dem dreißigsten Lebensjahr auf. Auffällig ist eine Assoziation der Sialadenose mit einer Reihe von Erkrankungen insbesondere mit endokrinen Erkrankungen, dystrophisch metabolischen Störungen sowie der Einnahme bestimmter Medikamente. So findet man Sialadenosen z.B. bei Patienten mit Diabetes mellitus. Auch findet sich eine Häufung bei mit Fehl- und Mangelernährung einhergehenden Erkrankungen, wie dem Alkoholismus, der Bulimie und Anorexie [Seifert, 1996].

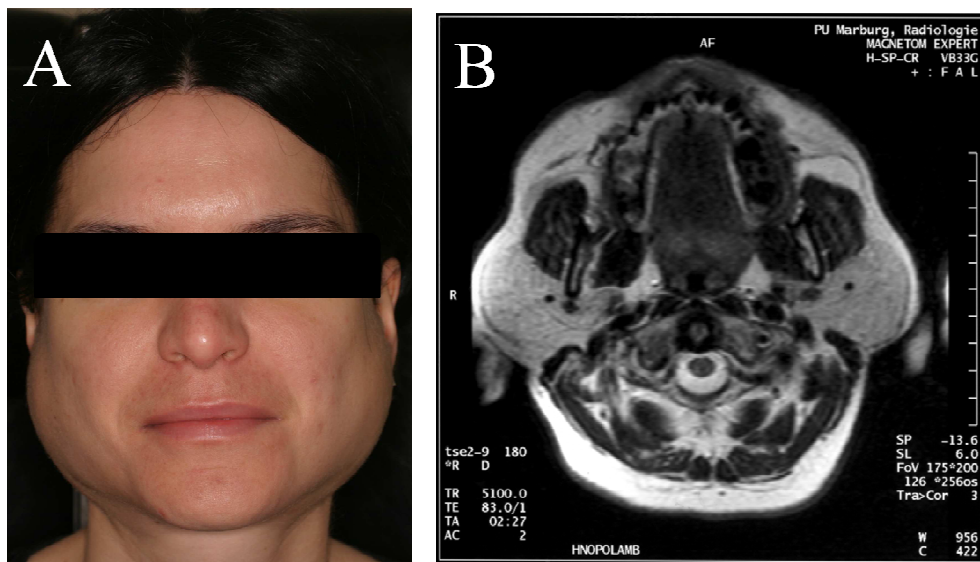


Abbildung 2. Klinische Manifestation der Sialadenose. (A) Sialadenosepatientin mit Schwellung der Glandulae parotidea. (B) MRT mit Darstellung einer massiven homogenen Schwellung der Glandulae parotidea.

Histologisch finden sich charakteristischerweise vergrößerte Azinuszellen, jedoch keine Entzündungszellen. Der Durchmesser der Azinuszellen - normal bis 30µm - kann bis zu 100µm betragen [Donath und Seifert, 1975].

Patienten, die an einer Sialadenose erkrankt sind, können sich sozial ausgegrenzt fühlen, wobei die äußerliche Veränderung – durch die beidseitige Drüsenschwellung verursacht – den Hauptgrund ausmacht. Bisherige Therapiemöglichkeiten stellen neben der Behandlung der assoziierten Erkrankungen ein abwartendes Verhalten, eine medikamentöse Therapie – meist versuchsweise mit einem Parasympathomimetikum z.B. in oraler Form als Drops - oder die Parotidektomie als operative Möglichkeit dar.

Die Sialadenose ist eine Erkrankung unbekannter Ätiologie. Bisher veröffentlichte Studien und Kasuistiken diskutierten ätiopathologisch überwiegend Veränderungen des autonomen Nervensystems im Rahmen einer demyelinisierenden Polyneuropathie: bei Störungen des sympathischen Anteils des autonomen Nervensystems kommt es zu einer Regulationsstörung der intrazellulären Proteinsynthese und Proteinsekretion. Dies führt zu einem Anschwellen des Zytoplasmas mit konsekutiver Vergrößerung der Azinidurchmesser [Donath und Seifert, 1975]. Letztendlich ist aber der dieser Erkrankung zugrunde liegende pathologische Prozess noch nicht endgültig geklärt.

1.3 Aquaporine

Aquaporine bilden eine Gruppe von Wasserkanälen. Ende der 1980iger Jahre wurde durch die Arbeitsgruppe um Peter Agre der erste Wasserkanal in der Zellmembran von Erythrozyten eher durch Zufall entdeckt. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnten mehr als zehn Isoformen charakterisiert und differenziert werden. Gewebe, in denen Aquaporinwasserkanäle gefunden werden, weisen eine 10- bis 100fach höhere Wasserpermeabilität im Vergleich zu Normalgewebe auf. Neben der Diffusion sind sie eine wichtige Komponente im Transport von Wasser durch die Zellmembran.

In den Speicheldrüsen des Kopf-Hals-Bereichs findet man unter anderem die Aquaporinwasserkanäle AQP3 und AQP5. AQP5 wird überwiegend an der apikalen Plasmamembran der Azinuszellen exprimiert, während AQP3 an der basolateralen Seite gefunden wird (Abbildung 3) [Gresz et al., 2001].

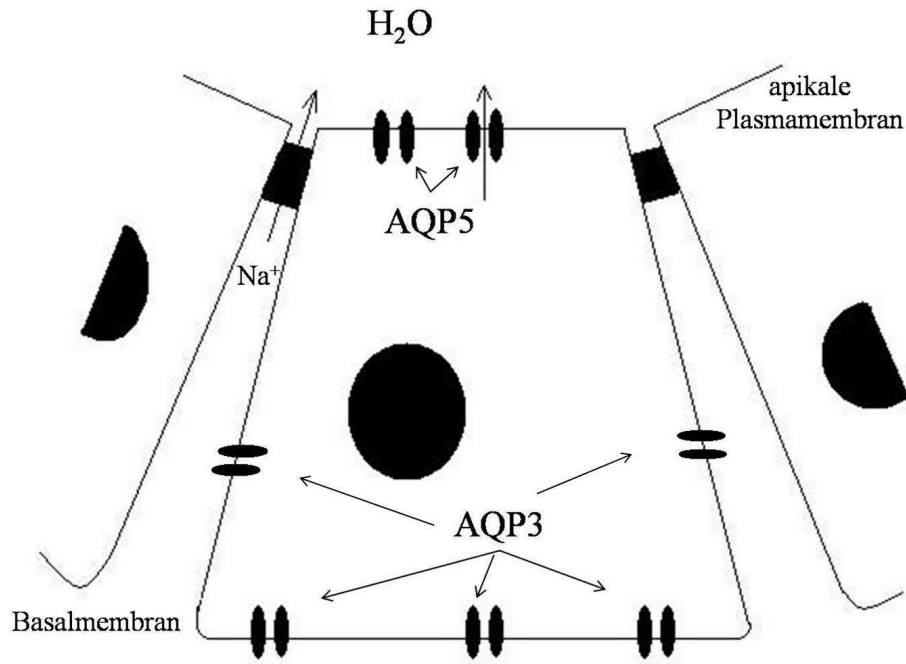


Abbildung 3. Lokalisation von Aquaporinwasserkanälen in Azinuszellen. An der apikalen Plasmamembran einer Speicheldrüsenazinuszelle findet man überwiegend AQP5. AQP3 ist an der basolateralen Membranseite lokalisiert [modifiziert nach Ishikawa, 2000].

AQP5-Wasserkanäle sind maßgeblich an der Produktion von hypotonem Speichel beteiligt [Lee *et al.*, 1996]. AQP3 wird außer in den Speicheldrüsen des Kopf-Hals-Bereichs nahezu ubiquitär in Epithelzellverbänden gefunden, an denen ein Wassertransfer stattfinden kann, wie im Urogenitalsystem, im Magen-Darm-Trakt, im Respirationstrakt und in der Epidermis [Matsuzaki *et al.*, 2002].

1.4 Zielsetzung

Bisher ist die Erkrankung der Sialadenose gekennzeichnet durch das Fehlen eines definierten pathologischen Prozesses. Unsere Arbeitsgruppe fand bei einer an Diabetes insipidus und Sialadenose erkrankten Patientin Hinweise auf eine Beteiligung von Aquaporinwasserkanälen bei der Pathogenese der Sialadenosen [Mandic *et al.*, 2005]. Das Ziel dieser Arbeit ist es, den Zusammenhang zwischen Aquaporinwasserkanälen – speziell AQP5 – und Sialadenosen weiterführend zu untersuchen.

2 Material und Patienten

Die verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sind in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet. Die Chemikalien entsprechen einer pro Analyse Qualität.

2.1 Chemikalien

Produkt	Firma
Antibody Diluent With Background Reducing Components	Dako, Glostrup, Dänemark
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Corbit-Balsam	I. Hecht, Kiel
3,3'-Diaminbenzidine Tablette (DAB)	Fa. Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ethanol	Schmidt Chemikalien, Dillenburg
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glycin	Riedel-de Haën, Seelze
HCl	Merck, Darmstadt
Hämalaun	Merck, Darmstadt
Hematoxylin Lösung	Fluka, Steinheim
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
NaCl	Roth, Karlsruhe
Normalserum	Fa. Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Phosphate buffered saline (PBS)	Biochrom KG, Berlin
Roti-Histol®	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Strept.-ABC-Komplex/HRP	Strept.-ABC-Komplex/HRP
TBS-Spülpuffer	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Tri-Natriumcitrat-Dihydrat-Puffer	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Tris Base	Sigma, Steinheim
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma, München Roth, Karlsruhe
Tris HCl	
Trypsin/ EDTA Solution	BioChrom, Berlin
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck, Darmstadt

2.2 Puffer und Lösungen

Tris-Buffer-Saline (TBS-Puffer)-Stammlösung:

0,91M NaCl; 0,1M Tris; pH7,4

Tris-HCL-Puffer-Stammlösung:

0,5M Tris; pH 7,4

Trypsin-Lösung (0,1%):

300mg Trypsin; 2,7mM CaCl₂; mit 300ml Tris-HCL-Puffer lösen; pH 7,5

PBS (0,15M):

0,14M NaCl; 2,71mM KCl; 7,5mM NaHPO₄•2H₂O; 1,47mM KH₂PO₄; pH 7,4

10mM Tri-Na-Citrat-Dihydrat-Puffer:

10mM Tri-Na-Citrat; pH 6

2.3 Antikörper

a.) Primärantikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1. Primärantikörper

Name	Antigen	Herkunft	Referenz, Hersteller
AQP2	C-terminales Ende von AQP2	Ziege, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology
AQP5	C-terminales Ende von AQP5	Ziege, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology

b.) Sekundärantikörper

Folgender Sekundärantikörper wurde bei der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen verwendet: Anti-Ziege (polyklonal)-Immunglobulin, DakoCytomation.

2.4 Patientengewebe

Zu den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen an Patientengewebe liegt ein positives Votum der Ethikkommission vor (Studientitel des Ethikantrags: „Zell- und Molekularbiologische Untersuchungen von Geweben, Biomolekülen und Kandidatengenomen bei Erkrankungen des Kopf- Hals-Bereichs“).

Nach Einwilligung der Patienten wurden die Gewebeproben im Rahmen von planmäßig durchgeführten Operationen entnommen. Für die immunhistochemischen Arbeiten wurden Paraffinblöcke angelegt (siehe unten).

2.5 Patientenkollektiv

In die immunhistochemischen Untersuchungen wurde nur dasjenige Parotisgewebe eingeschlossen, bei welchem histopathologisch die Diagnose Sialadenose postoperativ durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg, gestellt worden war. Speicheldrüsengewebe, welches histopathologisch nicht befundet war, wurde nicht in die Untersuchung mit eingeschlossen. Untersucht wurden histologisch gesicherte Sialadenosen von neun Patienten, die sich zwischen 2000 und 2005 am Klinikum

der Philipps-Universität Marburg in HNO-ärztlicher Behandlung befanden. Außerdem stand Ohrspeicheldrüsen-gewebe von Patienten, die an einem Sjögren Syndrom erkrankt waren, zur Verfügung.

2.6 Geräte

Automatische Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Wiesbaden
Autoklav	Vitaris, Baar
Ceran-Laborkocher SLK 6	SCHOTT Instruments GmbH, Mainz
Digitalwaage Sartorius handy	Sartorius GmbH, Göttingen
Eismaschine	ZIEGRA Eismaschinen GmbH, Isernhagen
Flüssigstickstoff-Kryobehälter Locator 6+	Nunc GmbH u. Co. KG, Langenselbold
Gefrierkühltruhe Nuaire (-85°C Ultralow Freezer)	ZAPF Instruments, Sarstedt
Heizplatte und Rührgerät	Sterilin, Aberbargoed, Großbritannien
HLC Heizblock Thermostat HBT 130-2	Kobe, Marburg
Inkubationsschüttler Duomax 1030	Heidolph Elektro GmbH, Kehlheim
Kühlschrank für pharmazeutische Präparate	SANYO FISHER Sales GmbH, München
Labor-Spülautomat, G 7883 CD	Miele, Gütersloh
Lichtmikroskop Telaval 31	Zeiss, Göttingen
Mikrotom	Leica, Bensheim
Mikrowelle Philips Space CUBE 50, M734	Philips, Hamburg
Mörser und Stößel	Haldenwanger, Berlin
Pasteur-Pipette	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Reinstwasseranlage NANOpure	Werner, Leverkusen
Tissue cool plate Cop20	Medite Medizintechnik, Burdorf
Ultra Tiefkühlschrank -86°C, MDF-U71V	SANYO FISHER Sales GmbH, München

Vortex-Genie 2

Scientific Industries, NY, USA

Wasserbad

Gesellschaft für Labortechnik ,Burgwedel

Zentrifuge (Labofuge 400 R)

Medifuge Heraeus, Hanau

Zentrifuge Universal (30 RF)

Hettich, Tuttlingen

3 Methoden

3.1 Morphometrie

Ein bedeutendes histopathologisches Unterscheidungsmerkmal zwischen Sialadenosen und Parotisnormalgewebe ist der Azinusgrößenunterschied. Sowohl die Gewebeschnitte des Patientenkollektivs als auch des Referenzgewebes wurden mit Hilfe der Software MCID-Elite (InterFocus Group, Linton, Großbritannien) auf die durchschnittliche Azinusgröße untersucht. Dabei wurden pro Gewebeprobe zwischen 6 und 10 Azini bezüglich ihre Fläche vermessen und der Durchmesser berechnet. Aus diesen Werten wurden die einzelnen Durchschnittswerte pro Patient, bzw. Referenzgewebe errechnet. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden jeweils für beide Gruppen ermittelt.

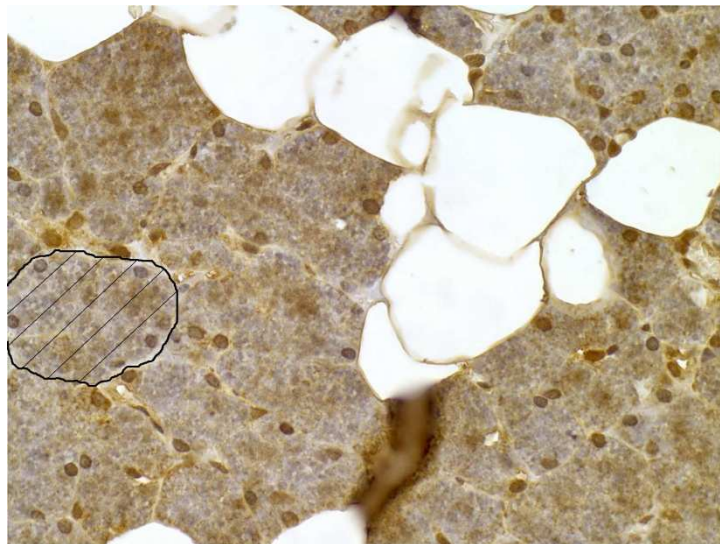


Abbildung 4. Markierung einzelner Azini zur Flächenbestimmung. Nach Markierung eines Azinus mit sichtbaren, randständigen Kernen wird mit Hilfe der Software MCID-Elite die Größe berechnet.

3.2 Immunhistologische Nachweismethoden

In der Immunhistochemie wird die Spezifität von Antikörpern genutzt, um die Verteilung und das Vorkommen von bestimmten Antigenen am histologischen Schnitt sichtbar zu machen. Entsprechend ihrer Gewinnung unterscheidet man polyklonale und monoklonale Antikörper.

Polyklonale Antikörper

Polyklonale Antikörper sind ein Gemisch von Immunglobulinen, das durch den natürlichen

Vorgang der Immunisierung nach Injektion eines Antigens in ein Tier (z.B. Kaninchen oder Schaf) gebildet und als sogenanntes Antiserum gewonnen wird. Polyklonale Antikörper bieten den Vorteil, dass sie mehrere antigene Determinanten aufgrund ihrer Bildung in verschiedenen B-Zellen erkennen. Sie sind daher gegenüber Veränderungen an einem Epitop, beispielsweise durch Fixierung, weniger anfällig als monoklonale Antikörper. Es kann jedoch aufgrund der Verschiedenheit der Antikörper häufiger zu unerwünschten Kreuzreaktionen mit anderen ähnlichen Antigenstrukturen kommen.

Monoklonale Antikörper

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper werden Plasmazellen, die aus einem immunisierten Tier entnommen wurden, mit Myelomzellen, also mit malignen entarteten Plasmazellen, fusioniert. Die entstandenen Hybride besitzen nun Eigenschaften einer malignen Tumorzelle und der Plasmazelle und bilden konstitutiv den spezifischen Antikörper. Monoklonale Antikörper sind sehr spezifisch, da sie nur ein Epitop erkennen. Sie sind jedoch gegenüber nur geringfügigen Änderungen des Epitops sehr empfindlich, so dass bei Denaturierung oder Vernetzung ein falsch negatives Ergebnis auftreten kann [Noll und Schaub-Kuhnen, 2000].

3.2.1 Die Avidin-Biotin-Methode: Prinzip

Die Avidin-Biotin-Methode wird eingesetzt, um im Vergleich zu anderen direkten und indirekten Methoden mit möglichst hoher Sensitivität gesuchte Antigene nachzuweisen. Avidin, ein Hühnereiweiß-Glykoprotein, besitzt eine sehr hohe Bindungsaffinität zu Biotin (Vitamin H), welches mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt worden ist. Werden die beiden Komponenten Avidin und Biotin zusammengeführt, bilden sich Avidin-Biotin-Enzymkomplexe. Diese binden über freie Bindungsstellen an biotinylierte Sekundärantikörper, die – gegen den antigenspezifischen Primärantikörper gerichtet – gewissermaßen als Brückenantikörper zwischen Primärantikörper und Avidin-Biotin-Enzymkomplexen dienen. Die Peroxidase soll in einem letzten Reaktionsschritt das Chromogen umsetzen. Häufig wird statt des Avidin auch das gentechnisch erzeugte Streptavidin eingesetzt, da es weniger häufig zu unspezifischen Reaktionen führt. Eine hohe Sensitivität wird nicht nur durch die hohe Bindungsaffinität (Dissoziationskonstante 10^{-19} mol/l), sondern auch dadurch erreicht, dass mehrere Avidin-Biotin-Enzymkomplexe an einen biotinylierten Sekundärantikörper binden können und dadurch die Dichte der Markerenzyme höher ist als bei einfacher direkter Nachweismethode.

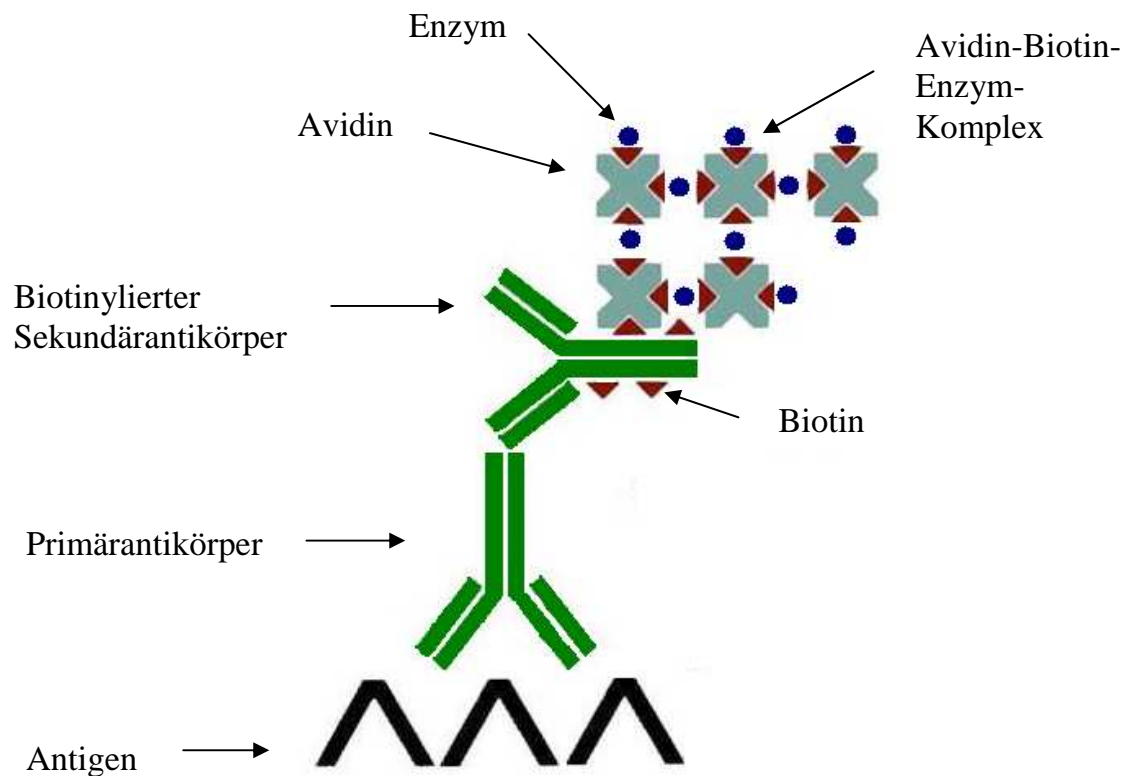


Abbildung 5. Avidin-Biotin-Methode (nach Noll, Urban & Fischer 2000).

3.2.2 Vorbereitung des Gewebes für die immunhistochemische Färbung

3.2.2.1 Organfixierung und Paraffineinbettung

Um möglichst dünne und gleichmäßige histologische Schnitte für die immunhistochemische Färbung zur Verfügung zu haben, wird das bei Routine-Operationen anfallende Gewebe in Paraffin eingebettet. Zunächst wird das Gewebe 24h in gepuffertem Formalin bei pH 7,4 fixiert. Um eine Konsistenzänderung bzw. Härtung des Gewebes – eine Voraussetzung für die Paraffineinbettung - zu erreichen, wird das Gewebe mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (bei 35°C 2x 2h in 70% Alkohol und 1x 1h in 90% Alkohol, dann bei +4°C ca. 12h in 100% Alkohol und zuletzt 2x5h nochmals in 100% Alkohol) entwässert. Da Paraffin in Alkohol praktisch nicht löslich ist, muss dieser mittels eines Intermediums wieder entfernt werden. Das Gewebe wird daher zunächst für ca. 12h bei +4°C, dann 2x für 5h bei 35°C in Roti-Histol eingelegt. Zur Herstellung der Gewebeblöcke wird jetzt Paraffin im Thermostat bei 50 bis

55°C zum Schmelzen gebracht und die Gewebeprobe für 1x 12h und 1x 24h hineingelegt. Hat das Paraffin das Gewebe vollständig durchtränkt, wird in einem letzten Schritt das Paraffin in Blockschalen ausgegossen und die Gewebeprobe somit möglichst plan zum Boden des Blockes fixiert.

3.2.2.2 Herstellung von Schnittpräparaten

Die Schnitte werden mit einem Serienmikrotom in einer Stärke von 4–6 µm angefertigt und zum Strecken in ein Wasserbad mit Temperaturen um 36°C gelegt. Anschließend werden diese auf für immunhistochemische Färbungen beschichtete Objektträger aufgezogen und bei 60°C im Wärmeschrank getrocknet.

3.2.2.3 Entparaffinierung und Rehydrierung

Zum vollständigen Herauslösen des Paraffins verbleiben die Präparate für 30 Minuten in Rotihistol. Anschließend muss das Gewebe in einer absteigenden Alkoholreihe (100% - 90% - 70%) rehydriert werden.

3.2.2.4 Inkubationsschema

Die endogene Enzymaktivität kann trotz Fixierung und Einbettung der Gewebeproben nicht vollständig ausgeschaltet werden. In einem ersten Schritt wird eine weitgehende Blockierung der endogenen Peroxidase durch Inkubation des Präparates in 200 ml Methanol mit 6 ml Wasserstoffperoxid erzielt. Das Präparat wird für 5 Minuten in Aqua dest. gewaschen und danach einer hitzeinduzierten Antigendemaskierung zugeführt. Die durch die Formalinfixierung möglicherweise entstandenen Aldehydvernetzungen von Antigenen werden durch 10 Minuten langes Kochen der Gewebeschnitte in Natrium-Citrat-Pufferlösung in der Mikrowelle (720 Watt) gelöst. Vor dem Waschen in TBS-Puffer (Tris-Buffer-Saline-Puffer) für 30 Minuten müssen die Schnitte in der zum Kochen verwendeten Küvette ca. 15 Minuten abkühlen. Zur Verhinderung unspezifischer Färbungen wird das Gewebematerial mit einer 3%igen BSA/PBS-Lösung (Bovine-Serum-Albumin/Phosphat-Buffer-Saline-Lösung) für 30 Minuten inkubiert. Vor dem Auftragen des Primärantikörpers wird die BSA-Lösung abgekippt.

3.2.3 Inkubation des Primär- und Sekundärantikörpers und Auftragung des Chromogens

Pro Schnitt werden circa 100 µl des Primärantikörpers in einer Verdünnung von 1:20 aufgetragen. Die Inkubation erfolgt bei 4°C über 12 Stunden. Nach dreimaligem Waschen der Schnitte in PBS für etwa 5 Minuten erfolgt das Auftragen des Sekundärantikörpers in einer

Konzentration von 1:100. Die Inkubationszeit beträgt eine halbe Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wird der 30 Minuten zuvor angesetzte ABC-Komplex auf die Gewebeschnitte pipettiert und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Nach einem Waschgang in PBS wird das Chromogen DAB (3,3'-Diaminobenzidin) von dem Enzym Peroxidase in ein braunes Farbprodukt umgewandelt. Der Schnitt wird unter fließendem Wasser kurz gewässert, mit Hämalun gegengefärbt und nach Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe mit einem Einschlußharz eingedeckt.

3.2.4 Positiv- und Negativkontrollen

Zur Überprüfung der Spezifität der Reaktion des Antikörpers mit dem gesuchten Antigen werden bei immunhistochemischen Färbungen Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Bei Negativkontrollen wird statt des Erstantikörpers die entsprechende Verdünnung an Normalserum aus der Spezies des Primärantikörpers aufgetragen. Bei Positivkontrollen wird der verwendete Antikörper auf Gewebeschnitte von Organen aufgetragen, in denen der Antigennachweis schon vorher etabliert wurde. Als Positivkontrolle für die AQP5-Färbungen dient das Parotisnormalgewebe, in welchem dieser Wasserkanal an der basolateralen bzw. apikalen Plasmamembran gefunden wurden.

4 Ergebnisse

In die vorliegende Arbeit wurde neben dem verwendeten Referenzgewebe von gesunden Ohrspeicheldrüsen nur Parotisgewebe, das postoperativ vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg, als Sialadenose befundet worden war, eingeschlossen. Histologisch gesicherte Sialadenosen von neun Patienten wurden untersucht. Aufgrund der Klinik und der Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen erfolgte zur Auswertung und Interpretation eine Einteilung in zwei Patientengruppen. Die erste Patientengruppe besteht aus denjenigen Patienten, deren endgültige Hauptdiagnose die Erkrankung der Sialadenose selbst darstellt. Die zweite Patientengruppe umfasst diejenigen Patienten, deren Hauptdiagnose eine andere Speicheldrüsenerkrankung bzw. Erkrankung anderer Ätiologie des Kopf-Hals-Bereichs darstellt, bei denen jedoch eine fokale Sialadenose bei der histologischen Aufarbeitung der Gewebeproben diagnostiziert wurde. Außerdem stand Ohrspeicheldrüsengewebe von zwei Patienten, die an einem Sjögren Syndrom erkrankt waren, für die immunhistochemischen Untersuchungen zur Verfügung. Bisher wurden in der Literatur neben einigen Arbeiten vor allem von Seifert, Chilla und Donath überwiegend Kasuistiken einzelner an Sialadenose erkrankter Patienten veröffentlicht. In Ergänzung zu diesen Kasuistiken wird im Folgenden neben den Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchungen die Klinik der an Sialadenose Erkrankten als Fallbeispiele dargestellt.

Tabelle 2. Patienten der ersten Patientengruppe mit der endgültigen Hauptdiagnose „Sialadenose“.

Patient	Alter	Geschlecht	Histologische Diagnose
3664/03	32	w	Sialadenose der Parotis
5626/00	58	m	Sialadenose der Glandula parotis. Nachweis eines kleinen Schaumzellnestes als Residuum einer abgelaufenen Entzündung
11952/04	88	w	Glandula parotis mit Sialadenose, chronischer Sialadenitis sowie umschriebenem Herd mit xanthomatöser Entzündung mit Fremdkörperreaktion

12188/04	53	m	Intraglandulärer Lymphknoten mit reaktiver Hyperplasie. Sialadenose der Glandula parotis
14326/03	70	w	Ausgeprägte diffuse Sialadenose

Tabelle 3. Patienten mit der Nebendiagnose „Sialadenose“ bei Vorliegen einer anderen Hauptdiagnose.

Patient	Alter	Geschlecht	Histologische Diagnose
5263/00	60	m	Plattenepithel-Ca sowie Speicheldrüsenanteile (Glandula parotis) mit geschwollenen Azini im Sinne einer Sialadenose
5767/03	62	m	Pleomorphes Adenom mit ausgedehnter verkalkter und verknöchelter chondroider Matrix. Sialadenose und Onkozytose des umliegenden Speicheldrüsen Gewebe
10415/03	51	m	Warthin Tumor; fokale Sialadenose
16579/00	50	m	Oropharynx-Ca; Sialadenose

4.1 Immunhistochemische Färbungen von Aquaporinwasserkanälen

Die Sialadenosegewebeschnitte wurden auf die Aquaporinwasserkanäle AQP5 und AQP2 untersucht. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte unter Berücksichtigung von Signalstärke und Lokalisation am binokularen Lichtmikroskop. Da die Signalstärke abhängig ist von der Anzahl der vorhandenen Aquaporinwasserkanäle, kann davon ausgegangen werden, dass an Stellen mit starkem Signal auch eine hohe Expressionsdichte vorliegt.

Nahezu im gesamten Patientenkollektiv zeigte sich ein spezifisches, jedoch verschieden starkes AQP5-Signal an der apikalen Membran der Azinuszellen. Ein spezifisches AQP5-Signal war im Normalgewebe regelmäßig aber schwach darstellbar.

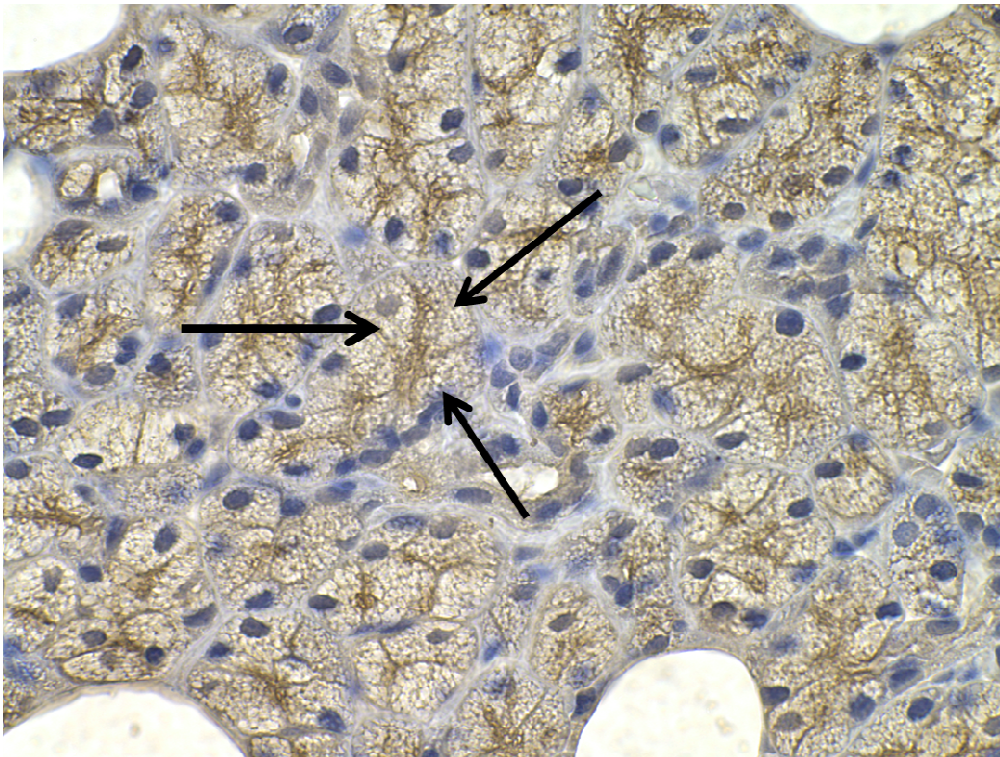


Abbildung 6. AQP5 in Sialadenosen. Beispiel für ein deutlich positives AQP5-Signal (Markierung durch Pfeile) an der apikalen Membranseite von Azinuszellen beim Vorliegen einer Sialadenose (Originalvergrößerung, x60).

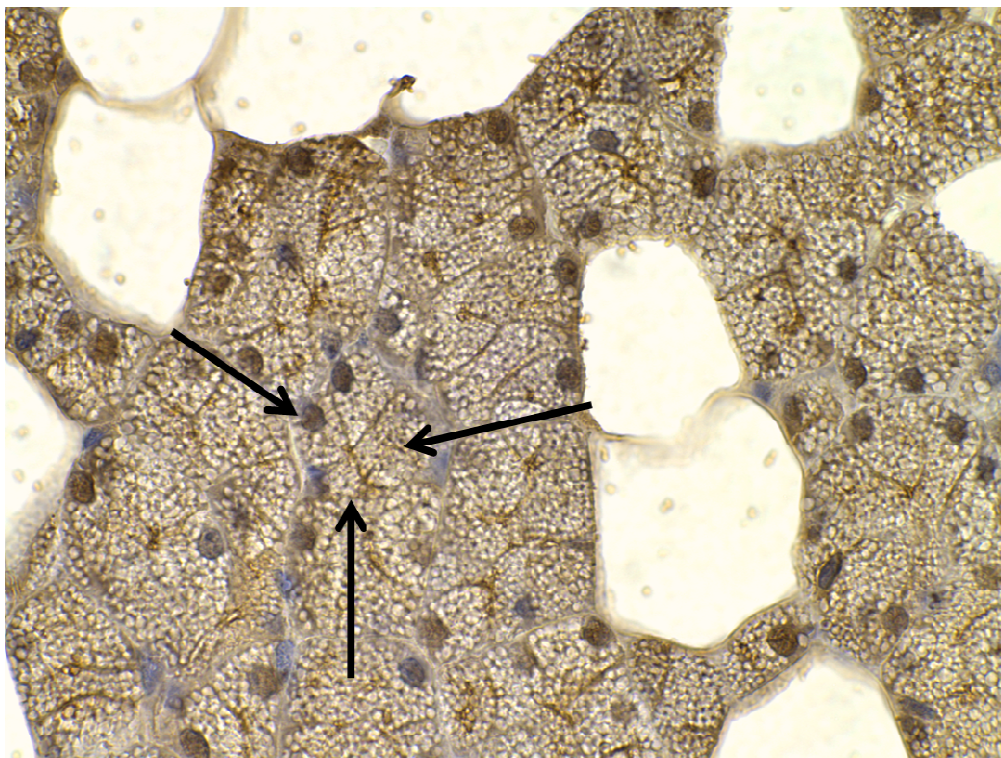


Abbildung 7. AQP5 in der gesunden Glandula parotidea. Beispiel für ein schwaches AQP5-Signal im Parotisnormalgewebe. Die schwarzen Pfeile markieren AQP5-Wasserkanäle an der apikalen Seite der Azinuszellen (Originalvergrößerung, x60).

Das AQP5-Signal zeigt sich in derjenigen Patientengruppe, deren histologisch gesicherte Hauptdiagnose die Sialadenose selbst darstellt (siehe auch Tabelle 2), bei ca. 80% der durchgeführten Färbungen deutlich positiv. Bei den übrigen gefärbten histologischen Schnitten war dieses nur mäßig oder in Teilabschnitten vorhanden (siehe Abbildungen 10, 12 und 14 bzw. 11 und 13). Innerhalb der zweiten Patientengruppe (siehe auch Tabelle 3) war das Signal bei 50% schwach, bei der anderen Hälfte mäßig bis gut darstellbar. Zur zweiten Patientengruppe wurden alle Patienten gerechnet, bei denen sich histopathologisch zwar ebenfalls eine fokale Sialadenose fand, diese jedoch als Nebebefund anderer Grunderkrankungen (siehe Abbildungen 15 und 16 bzw. 17 und 18).

Kontrollfärbungen des Speicheldrüsengewebes auf AQP2, das typischerweise in den Sammelrohren der Niere exprimiert wird, waren in beiden Patientengruppen erwartungsgemäß negativ. Als Positivkontrolle diente für die AQP5-Färbungen das Parotisnormalgewebe.

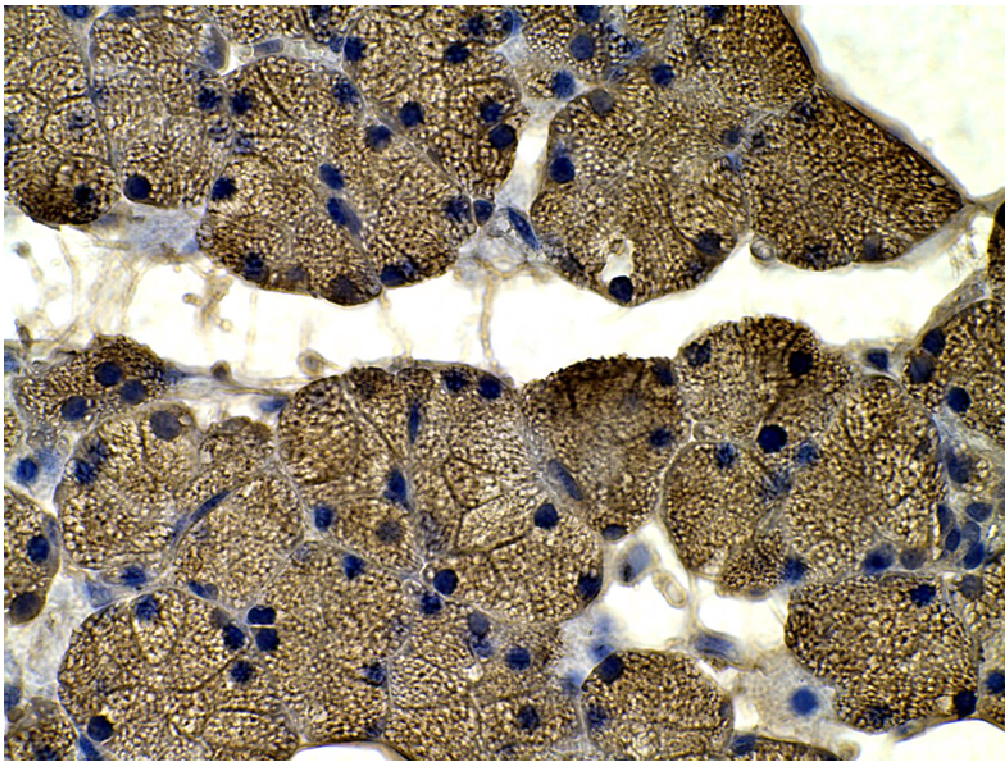


Abbildung 8. Färbungen auf AQP2 in Sialadenosen zeigten erwartungsgemäß kein spezifisches Signal an der apikalen Plasmamembranseite. (Originalvergrößerung, x60).

Neben dem bisher dargestellten deutlichen semiquantitativen AQP5-Signalunterschied zwischen Parotisnormalgewebe und Sialadenosen zeigte sich bei nahezu allen immunhistochemischen Färbungen der Sialadenosen auf AQP5 im Vergleich zu Parotisnormalgewebe und im Vergleich mit anderen Erkrankungen des Ohrspeicheldrüsengewebes (z.B. Sjögren-Syndrom) eine morphologisch unterschiedliche Verteilung des AQP5-Signals. Im Parotisnormalgewebe zeigte sich das AQP5-Signal streng im Bereich der apikalen Plasmamembran „wie auf einer Linie“ lokalisiert. Ähnlich zeigte es sich in unseren Färbungen des Ohrspeicheldrüsengewebes von Patienten, die an einem Sjögren-Syndrom erkrankt waren. Bei Sialadenosen hingegen zeigte sich eine eher diffuse Verteilung des AQP5-Signals nicht nur entlang der apikalen Plasmamembran, sondern auch innerhalb der Azinuszellen um die Plasmamembran herum (siehe auch Abbildung 9).

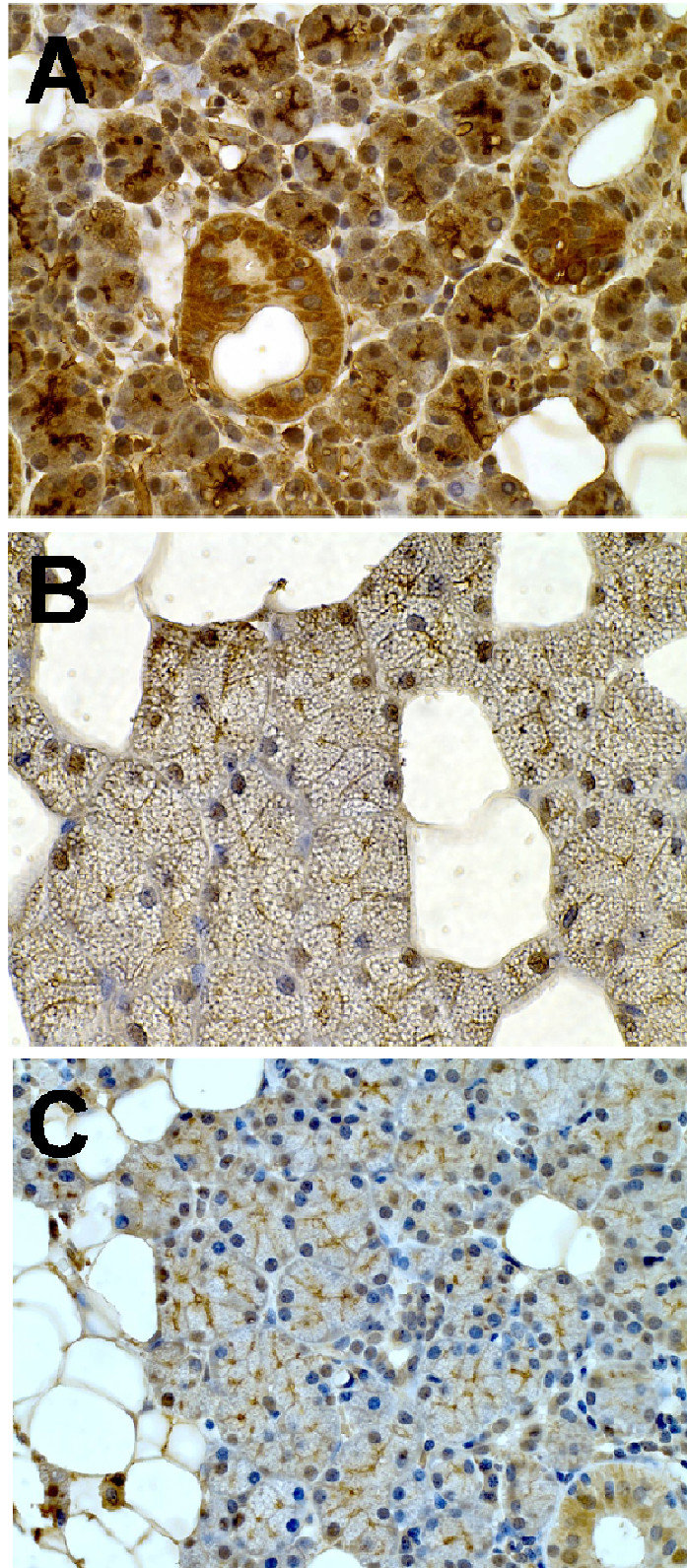


Abbildung 9. Lokalisation von AQP5 in der gesunden und erkrankten Glandula parotidea. Vergleich zwischen Sialadenose (A), Parotisnormalgewebe (B) und Parotis eines an M. Sjögren erkrankten Patienten(C). Deutlicher Unterschied in der apikalen Verteilung von AQP5.

4.2 Morphometrische Untersuchungen

Mitbestimmend für die Ergebnisinterpretation der immunhistochemischen Färbungen sind die durchgeführten morphometrischen Untersuchungen, die einen deutlichen Größenunterschied der Aziniquerschnittsflächen bzw. der Azinidurchmesser zeigen. In Sialadenosen findet man bis auf das doppelte Zellvolumen vergrößerte Azinuszellen. Die morphometrischen Untersuchungen sind in Übereinstimmung mit der histopathologisch gestellten Diagnose Sialadenose.

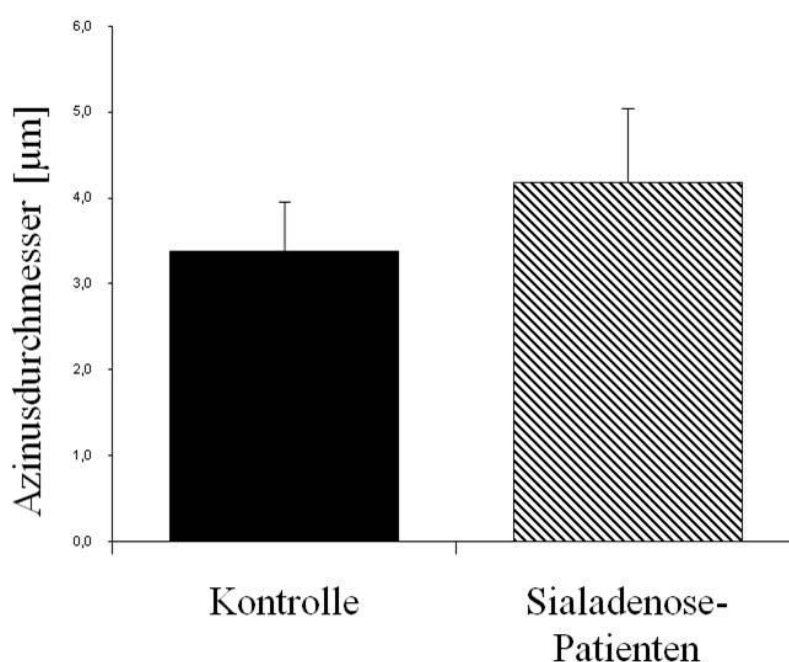


Abbildung 10. Azinusgrößenunterschied (1). Ein wesentliches histopathologisches Merkmal von Sialadenosen ist der im Vergleich zu Parotisnormalgewebe vergrößerte Azinidurchmesser. Vergleichende Darstellung der durchschnittlichen Messergebnisse des Azinidurchmessers bei Parotisnormalgewebe (Kontrolle) und Sialadenosen und der Standardabweichung.

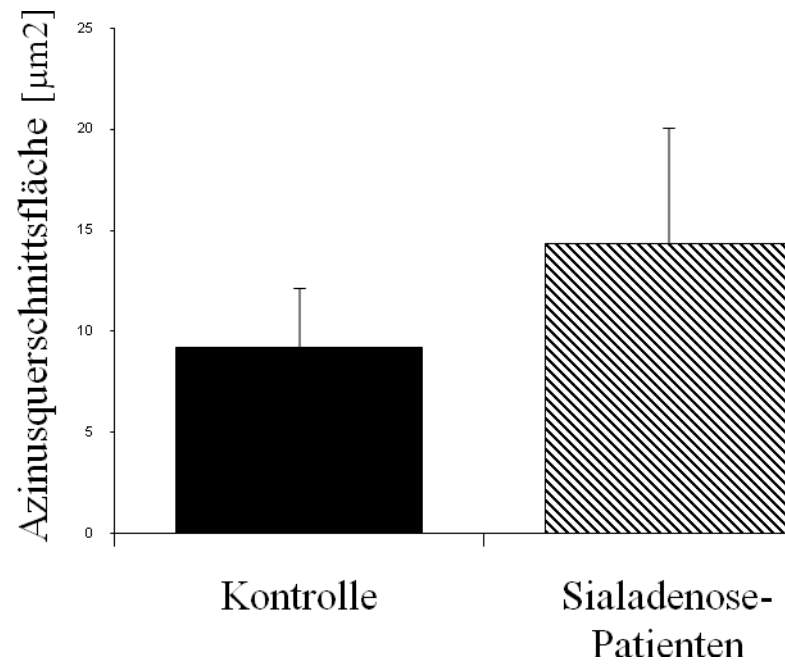


Abbildung 11. Azinusgrößenunterschied (2). Entsprechend der Vergrößerung des Azinusdurchmessers bei Sialadenosen kommt es zu einer Vergrößerung der Azinusquerschnittsfläche.

4.3 Klinische Kasuistiken

Bei den untersuchten Patienten zeigte sich ein recht uneinheitliches klinisches Bild. Im Folgenden werden nur die Patienten der ersten Patientengruppe dargestellt, da die Klinik der Patienten der zweiten Gruppe im Wesentlichen durch eine Speicheldrüsenerkrankung bzw. Erkrankung des Kopf-Hals Bereichs anderer Ätiologie geprägt ist.

Die im Folgenden dargestellten 5 Patienten mit der Hauptdiagnose Sialadenose (vergleiche Tabelle 2) befanden sich zwischen 2000 und 2005 in der Universitäts-HNO-Klinik Marburg in ärztlicher Behandlung. Die drei weiblichen und zwei männlichen Patienten waren zwischen 32 und 88 Jahre alt, wobei das mittlere Alter 60,2 Jahre betrug. In vier von fünf Fällen führte eine einseitige Schwellung der Glandula parotis zur ärztlichen Vorstellung der Patienten. Nur in einem Fall lag eine beidseitige Drüsenschwellung vor. Zwei der fünf Erkrankten klagten über Schmerzen im Bereich der Schwellung bzw. zeigten einen druckdolenten Palpationsbefund. Eine sich an die Palpation anschließende sonographische Untersuchung wurde bei allen Patienten durchgeführt, deren Befunde weiter unten einzeln aufgelistet werden (vergleiche Seite 26-34). Bei vier der fünf Fälle wurde zusätzlich eine Feinnadelpunktion durchgeführt. In allen Fällen wurde präoperativ ein Magnetresonanztomogramm der Kopf-Hals-Region angefertigt. Eine Häufung von anderen Grunderkrankungen ist in den untersuchten Patientenfällen nicht zu finden. Das Krankheitsspektrum reicht von arterieller Hypertonie und Herzinsuffizienz über Malnutrition bei Alkoholismus und Colitis ulcerosa bis hin zur Bulimie. Eine Medikamenteneinnahme fand sich bei vier der Patienten. Ein Nikotinabusus wurde von einem der Patienten bejaht.

Die Auswertung der Patientenakten erfolgte anhand eines Fragebogens, der die wichtigsten diagnostischen Schritte bis hin zur endgültigen histologischen Diagnosesicherung berücksichtigte.



UNIVERSITÄTSKLINIKUM GIESSEN UND MARBURG GMBH

Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
Deutschhausstraße 3, 35037 Marburg

Direktor: Prof. Dr. J. A. Werner

Tel.: (06421) 28 66478

Fax: (06421) 28 66367

Standort Marburg



Datenerfassungsbogen

Name:

Geburtsdatum:

Alter bei Erstdiagnose:

Geschlecht:

Klinik/Anamnese:

Ein- oder doppelseitige Schwellung:

Veränderung des Speichels:

Zeitdauer:

Mundtrockenheit:

Schmerzanamnese:

Assoziierte Vorerkrankungen:

Endokrine Erkrankungen:

Dystrophisch metabolische Störungen:

Medikamentenanamnese:

Diagnosestellung:

Sonographie:

MRT/ CT-Untersuchung:

Feinnadelbiopsie/Stanzbiopsie:

Therapie:

konservativ:

operativ:

Abbildung 12. Datenerfassungsbogen.

Tabelle 4. Patienten mit histologisch gesicherter Hauptdiagnose Sialadenose. Darstellung assoziierter Erkrankungen.

Patient	Alter	Geschlecht	Assoziierte Erkrankungen
3664/03	32	w	Bulimie
5626/00	58	m	Epilepsie
11952/04	88	w	Arterielle Hypertonie, Herzinsuffizienz
12188/04	53	m	Depression, Colitis ulcerosa, chronische Alkoholabhängigkeit
14326/03	70	w	Struma Grad 3, V.a. multifokale Autonomie

Patient 3664/03, eine 32 Jahre alte Frau, stellt sich mit einer seit ca. 15 Jahren bestehenden beidseitigen Schwellung der Ohrspeicheldrüsen vor, da die Schwellung in den letzten 3 Wochen extrem zugenommen habe. Die Patientin leidet seit ca. 20 Jahren an Bulimie und wünscht eine Parotidektomie aus kosmetischen Gründen. Sie befindet sich seit Jahren immer wieder in ambulanter und stationärer psychiatrischer Behandlung. Derzeit erfolgt eine medikamentöse Therapie mit Antidepressiva. Sonographisch zeigt sich eine massive Vergrößerung beider Ohrspeicheldrüsen. Dies wird in der MRT-Untersuchung bestätigt ohne Nachweis einer invasiven Raumforderung. Auch die Glandula submandibularis ist vergrößert. Nach einer zweizeitigen Operation bestätigt sich histologisch die Verdachtsdiagnose einer Sialadenose.

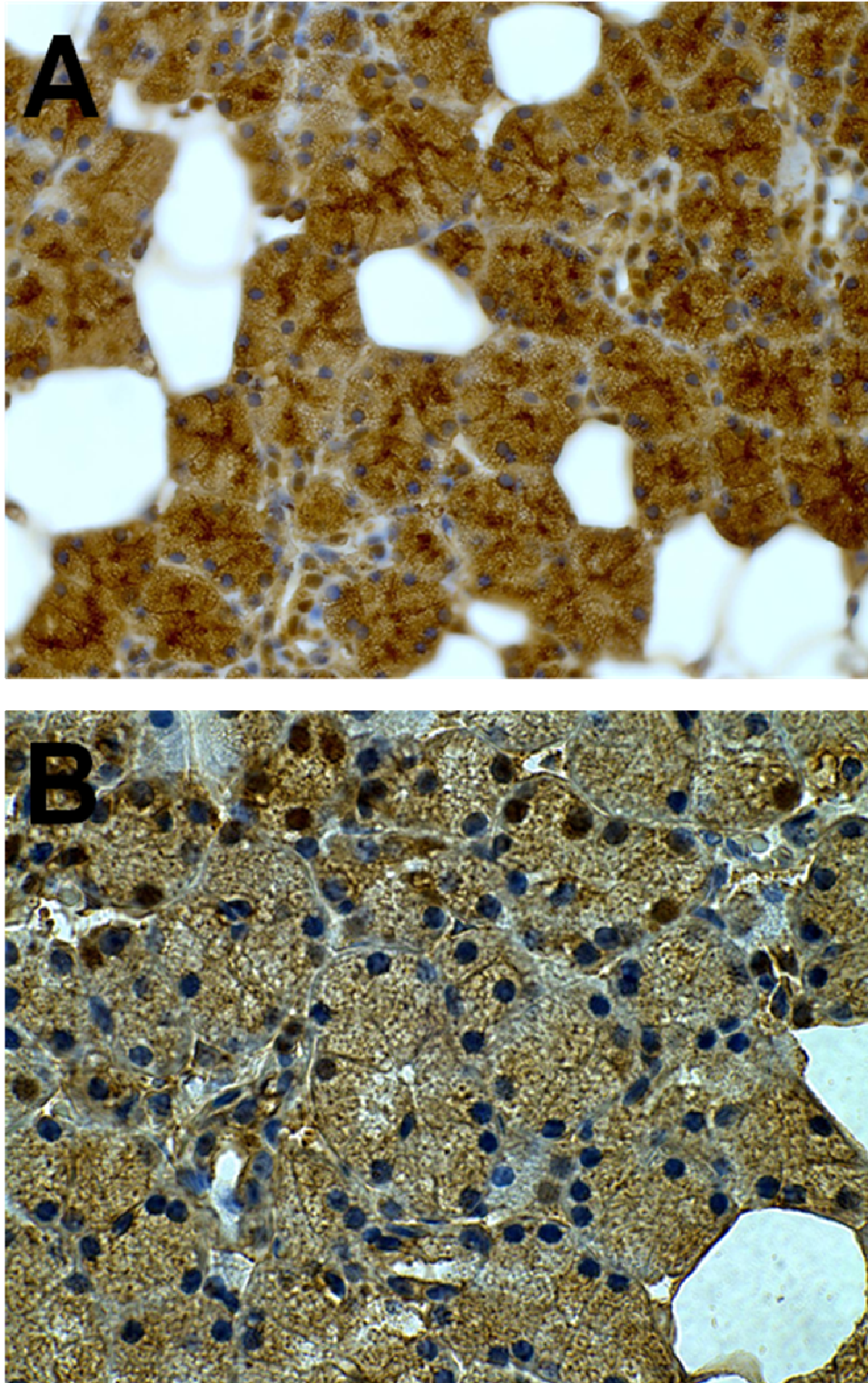


Abbildung 13. Patient 3664/03: Immunhistochemische Färbungen (A) stark positives AQP5-Signal an der apikalen Seite der Azinuszellen (B) Negativkontrolle (Originalvergrößerung, x60).

Bei **Patient 5626/00** handelt es sich um einen bei Diagnosestellung 58jährigen Mann, der aufgrund einer einseitigen, seit 2 Tagen progredienten Schwellung der Glandula parotis vorstellig wird. In der Eigenanamnese berichtet der Patient über ein bekanntes Epilepsieleiden. In der vegetativen Anamnese wird ein ausgeprägter Nikotinkonsum (ca. 90 py), aber zurzeit kein Alkoholkonsum angegeben. Bedarfsweise wird ein Nitrospray appliziert. In der klinischen Untersuchung zeigt sich eine indolente, nicht verschiebliche Raumforderung der linken Glandula parotis. Sonographisch kann im unteren Pol der Ohrspeicheldrüse eine echoarme Raumforderung dargestellt werden. Die durchgeführte Feinnadelpunktion ist zytologisch unauffällig. In der Magnetresonananzuntersuchung wird eine Speichelzyste der linken Parotis beschrieben. Da aufgrund der bisherigen Ergebnisse differentialdiagnostisch auch an das Vorliegen eines Warthin-Tumors gedacht werden muss, wird eine laterale Parotidektomie links durchgeführt. In der histologischen Aufarbeitung ergibt sich der Befund einer Sialadenose.

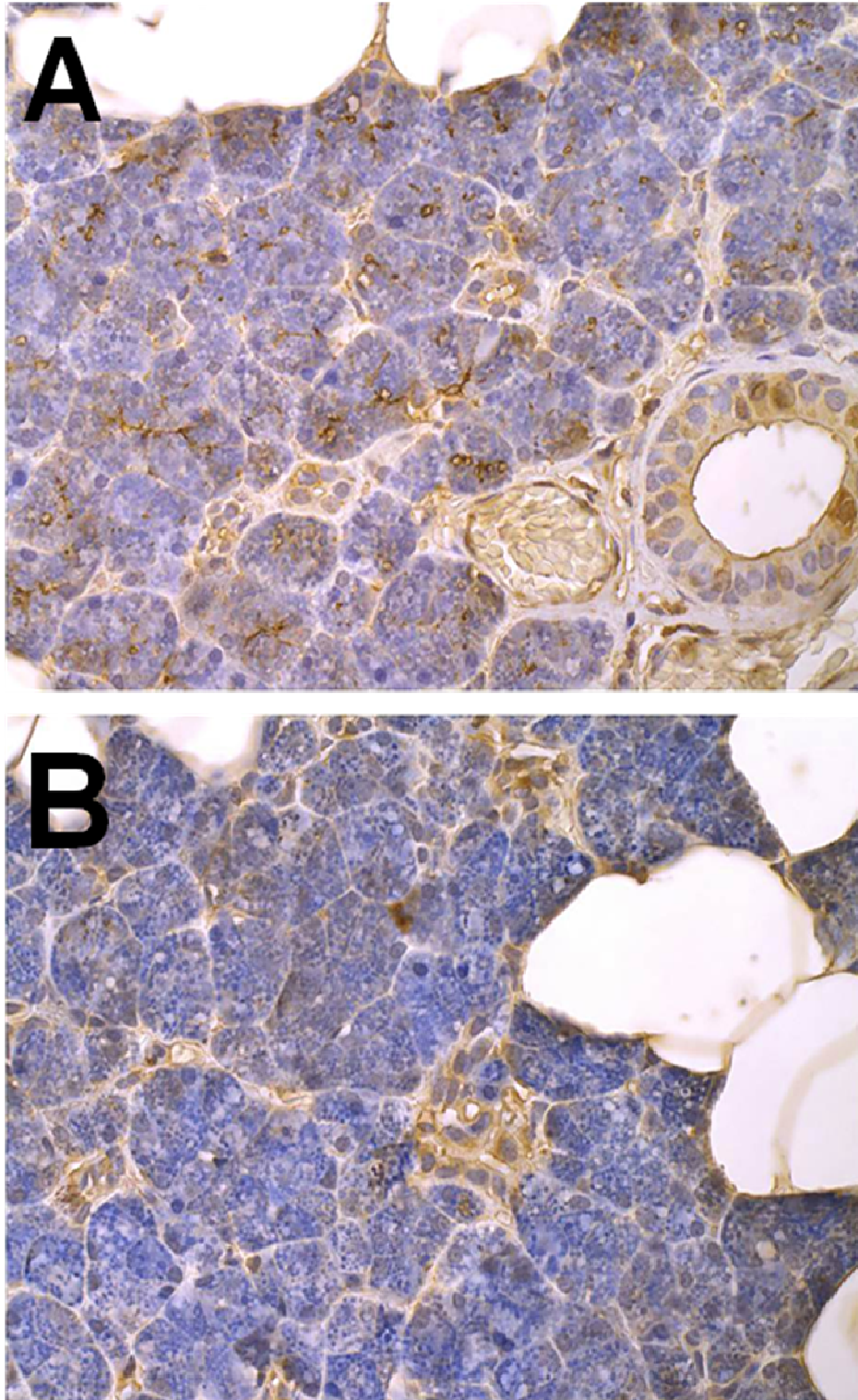


Abbildung 14. Patient 5626/00: Immunhistochemische Färbungen (A) mäßig positives AQP5-Signal an der apikalen Seite der Azinuszellen (B) Negativkontrolle (Originalvergrößerung, x40).

Patient 11952/04, eine bei Diagnosestellung 88 jährige Frau, stellt sich mit einer progredienten Raumforderung im Bereich der rechten Glandula parotis und einer kutanen Veränderung retroaurikulär rechts vor. Die Schwellung sei, unabhängig vom Essen, seit ca. 6 Tagen vermehrt aufgetreten und schmerzhaft. An Vorerkrankungen berichtet die Patientin im Wesentlichen über eine bekannte Herzinsuffizienz und einen arteriellen Hypertonus. Die klinische Untersuchung zeigt eine harte, unverschiebliche, druckschmerzhaft Raumforderung ohne jegliche Entzündungszeichen und eine kutane Veränderung retroaurikulär. Die sonographisch gesteuerte Feinnadelpunktion erbringt einen unklaren malignomverdächtigen Befund. In der MRT-Untersuchung zeigt sich kein sicherer Hinweis für eine Raumforderung. Aufgrund des suspekten Befundes und der kutanen Veränderungen wird eine laterale Parotidektomie rechts und eine Exstirpation der kutanen Veränderung durchgeführt. Nach der histologischen Aufarbeitung wird die endgültige Hauptdiagnose einer Sialadenose gestellt, wobei auch Bereiche einer chronischen Sialadenitis sowie einer umschriebenen chronischen xanthomatösen Entzündung mit Fremdkörperreaktion und einer epidermalen Hornzyste nachweisbar waren.

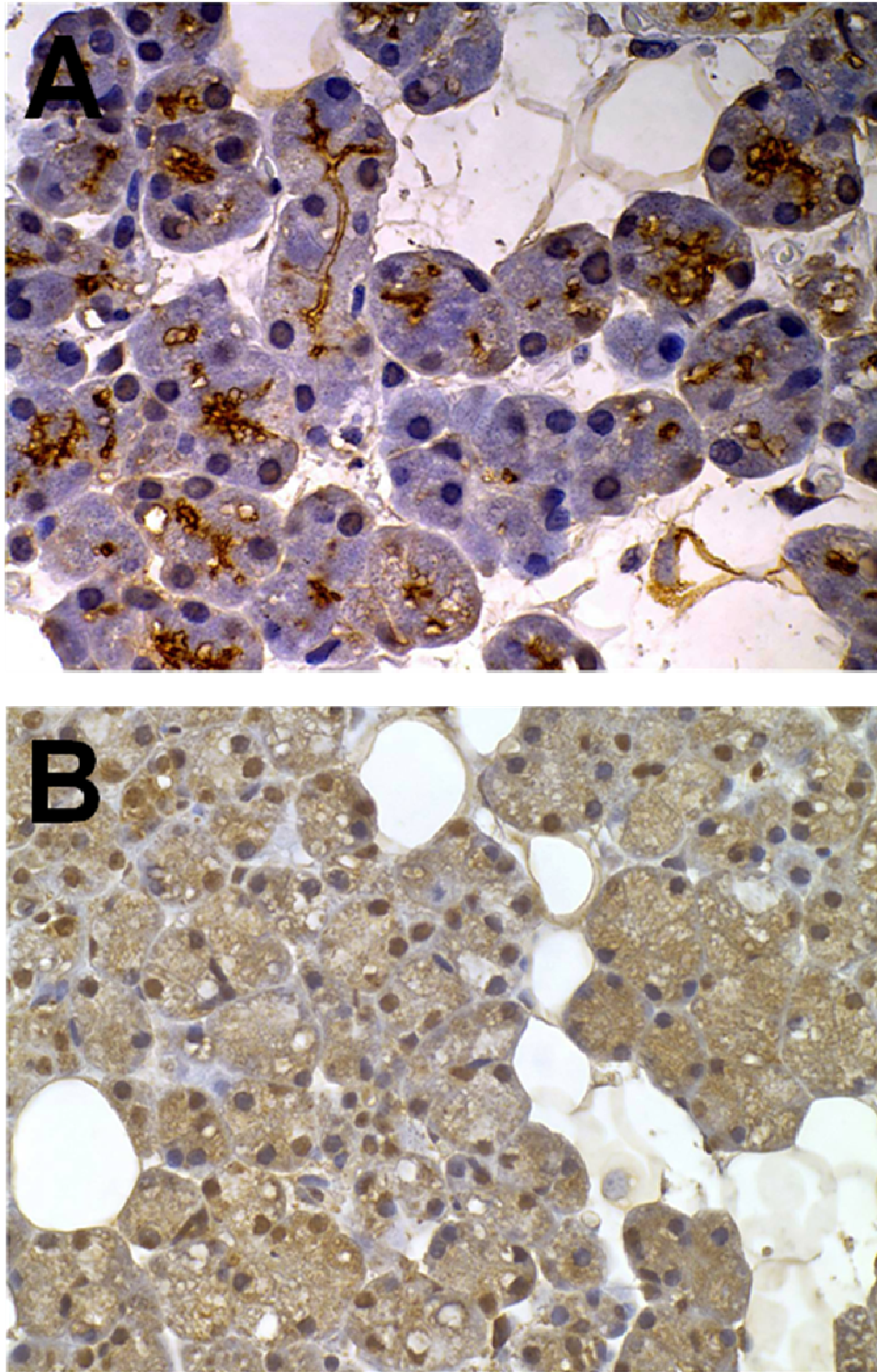


Abbildung 15. Patient 11952/04: Immunhistochemische Färbungen (A) deutlich positives AQP5-Signal an der apikalen Seite der Azinuszellen (B) Negativkontrolle (Originalvergrößerung, x60).

Patient 12188/04, ein 53jähriger Mann, berichtet über eine seit ca. 14 Tagen bestehende, nicht druckschmerzhaftes Schwellung im Bereich der rechten Glandula parotis. An Vorerkrankungen seien eine Depression, eine bereits operativ behandelte Colitis ulcerosa, eine Tiefton betonte Schwerhörigkeit und ein Bandscheibenprolaps bekannt. Außerdem besteht eine Alkoholkrankheit, zurzeit Abstinenz. Die regelmäßige Medikation besteht aus einem Benzofibrat, einem Antipsoriatikum, einem Antidepressivum und einem Urospasmolytikum. Nikotinabusus wird verneint. In der klinischen Untersuchung zeigt sich eine gut abgrenzbare, verschiebbare, prall elastische, indolente Raumforderung. Sonographisch wird der Verdacht auf eine Zyste geäußert. Eine Feinnadelbiopsie erbringt jedoch keine eindeutigen Pathologika. Die MRT-Untersuchung erbringt den Verdacht auf ein Adenom. Nach lateraler Parotidektomie ergibt sich die Diagnose Sialadenose sowie der Nachweis eines intraglandulären Lymphknotens mit reaktiver follikulärer Hyperplasie.

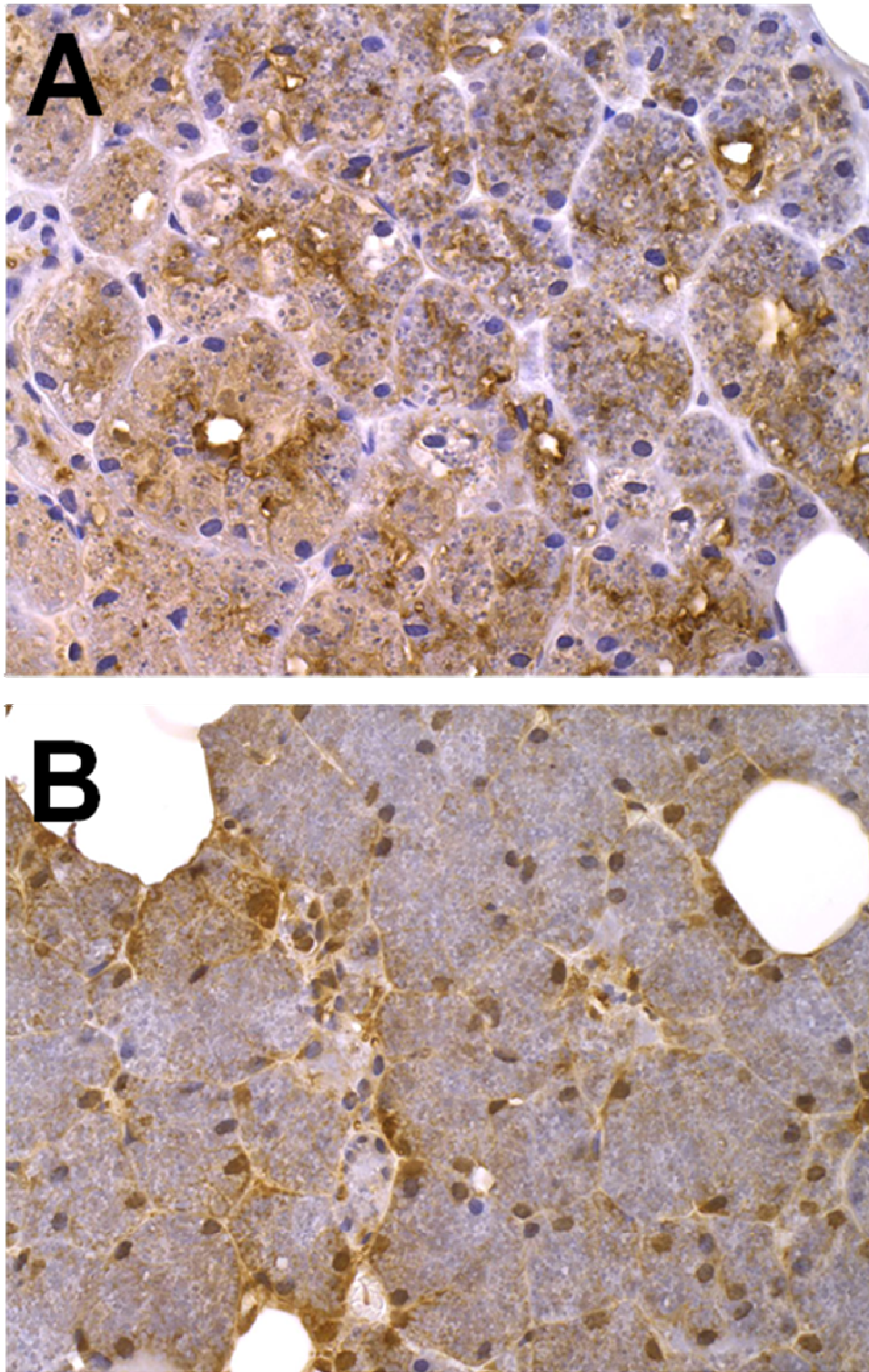


Abbildung 16. Patient 12188/04: Immunhistochemische Färbungen Sialadenose (**A**) mäßig positives AQP5-Signal an der apikalen Seite der Azinuszellen (**B**) Negativkontrolle (Orginalvergrößerung, x40).

Bei **Patient 14326/03** handelt es sich um eine bei Diagnosestellung 70jährige Frau, die seit ca. 2 bis 3 Wochen eine schmerzlose, weiche Schwellung im Bereich der rechten Ohrspeicheldrüse bemerkt hat. Die Frage nach Mundtrockenheit wird verneint. In der klinischen Untersuchung fällt außer oben genannter Raumforderung eine Struma Grad III auf. Es sind keine weiteren Vorerkrankungen bekannt, zudem kein Nikotin- oder Alkoholabusus. Sonographisch zeigt sich eine homogene Schwellung der Glandula parotis rechts ohne Anhalt für Abszess. Das zytologische Ergebnis der Feinnadelpunktion ist unauffällig. Bei der Patientin wird eine Speicheldrüsenszintigraphie durchgeführt. Dabei zeigt sich eine nahezu funktionslose linke Drüse bei völlig unauffälliger Speicheldrüsenfunktion im Bereich der übrigen Speicheldrüsen. Nach Durchführung einer lateraler Parotidektomie rechts erfolgt die histologische Diagnose einer Sialadenose.

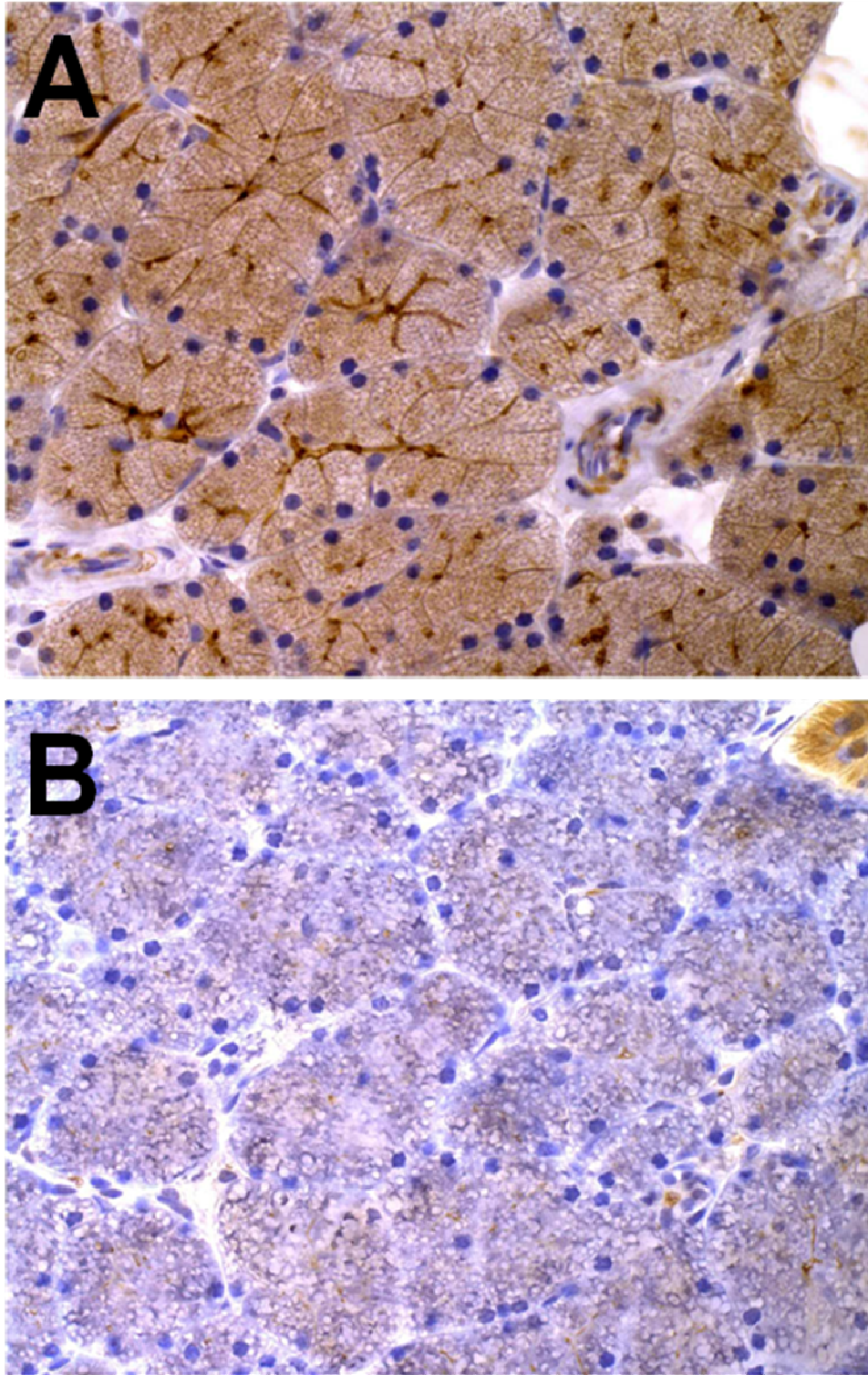


Abbildung 17. Patient 14326/03: Immunhistochemische Färbungen (**A**) deutlich positives AQP5-Signal an der apikalen Seite der Azinuszellen (**B**) Negativkontrolle (Originalvergrößerung, x60).

Im Folgenden sind immunhistochemische Färbungen auf AQP5 der Sialadenosen der zweiten Patientengruppe dargestellt. Die Klinik der Erkrankten entsprach der Grunderkrankung.

Tabelle 5. Darstellung der zweiten Patientengruppe mit Hauptdiagnose.

Patient	Alter	Geschlecht	Hauptdiagnose
<hr/>			
5263/00	60	m	Plattenepithelkarzinom
5767/03	62	m	Pleomorphes Adenom
10415/03	51	m	Warthin Tumor
16579/00	50	m	Oropharynxkarzinom

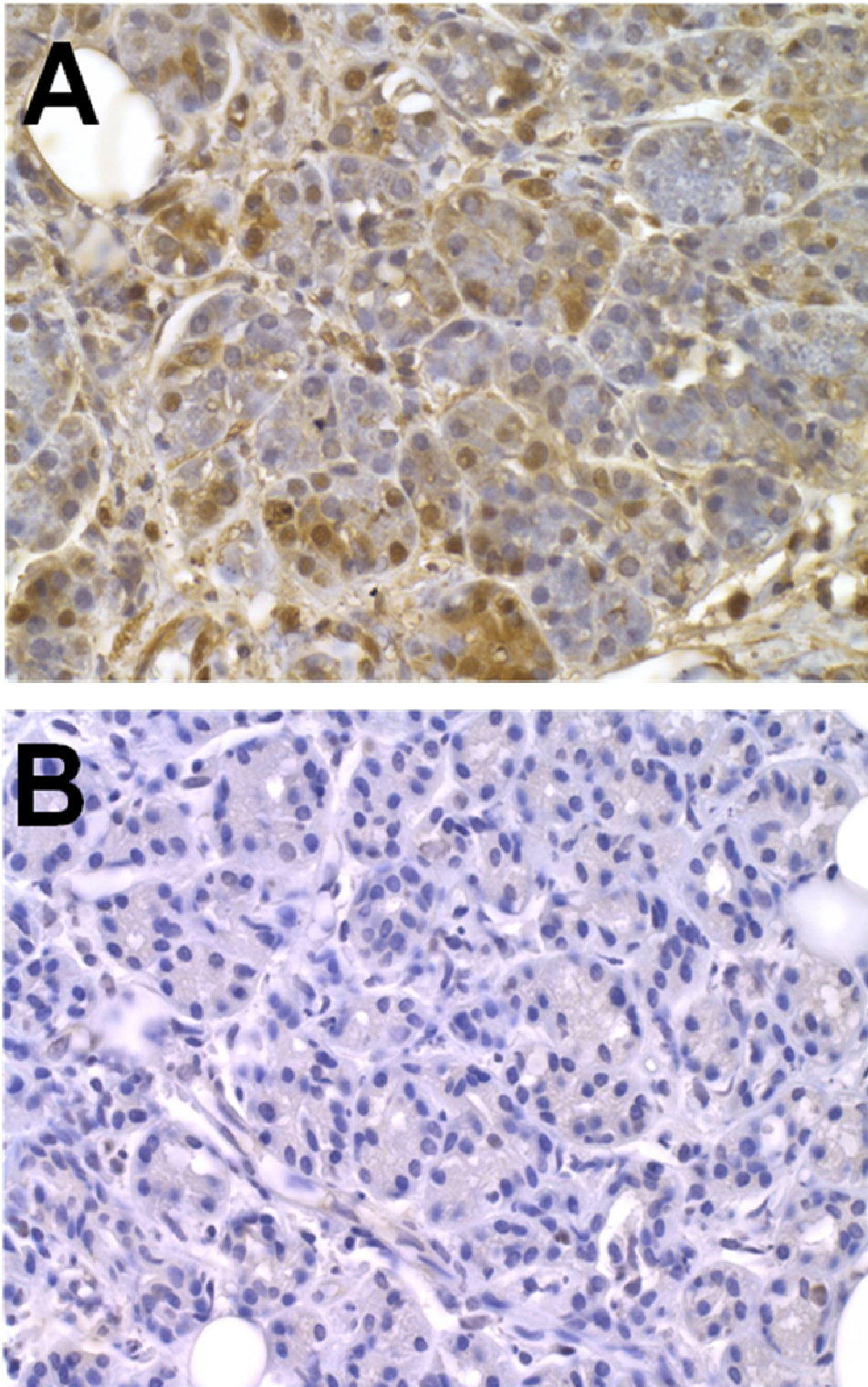


Abbildung 18. Patient 5263/00: Immunhistochemische Färbungen **(A)** schwach positives AQP5-Signal an der apikalen Seite der Azinuszellen **(B)** Negativkontrolle (Originalvergrößerung, x60).

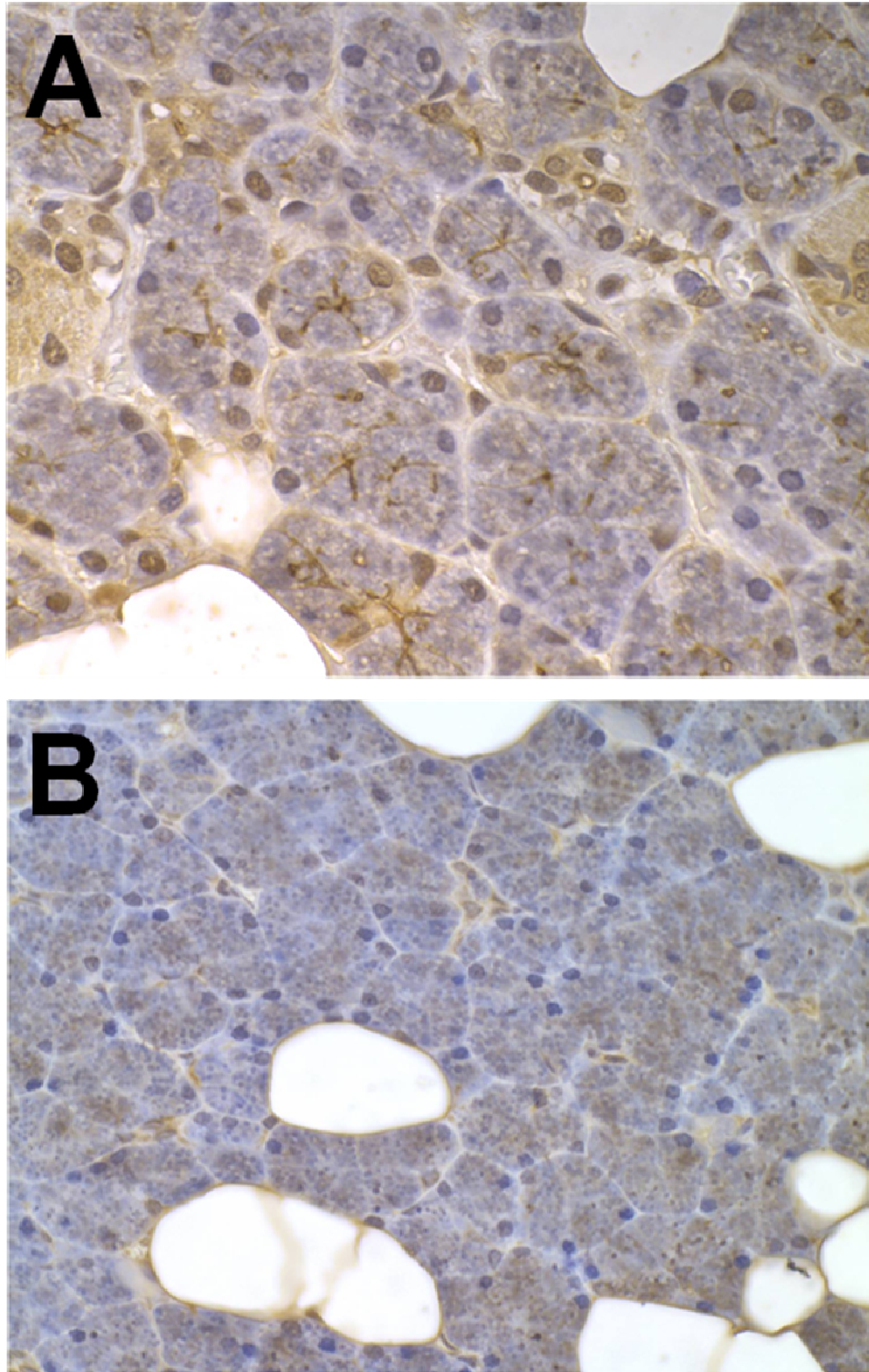


Abbildung 19. Patient 5767/03: Immunhistochemische Färbungen (A) schwach positives AQP5-Signal an der apikalen Seite der Azinuszellen (B) Negativkontrolle (Originalvergrößerung, x60).

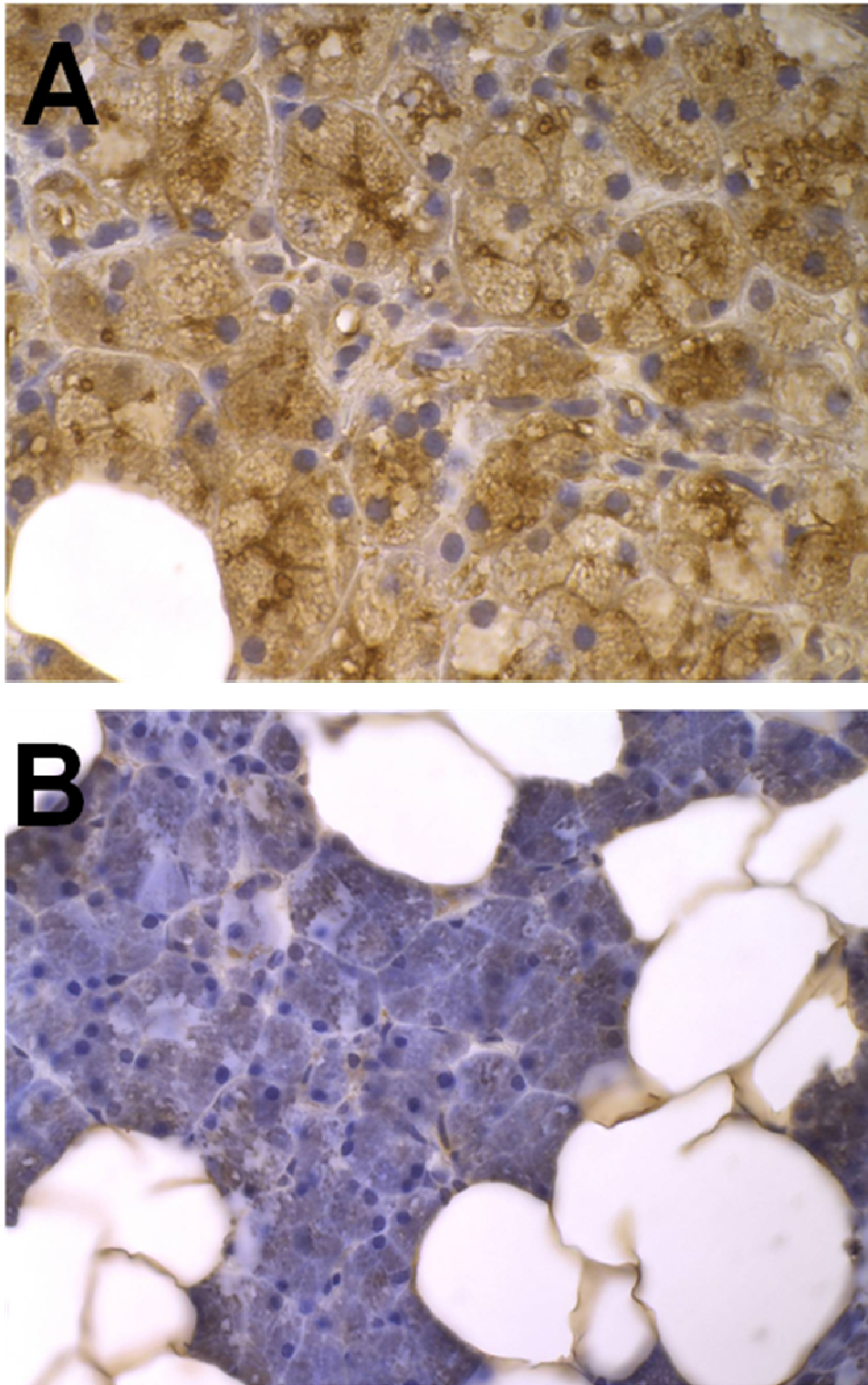


Abbildung 20. Patient 10415/03: Immunhistochemische Färbungen **(A)** mäßig positives AQP5-Signal an der apikalen Seite der Azinuszellen **(B)** Negativkontrolle (Originalvergrößerung, x60).

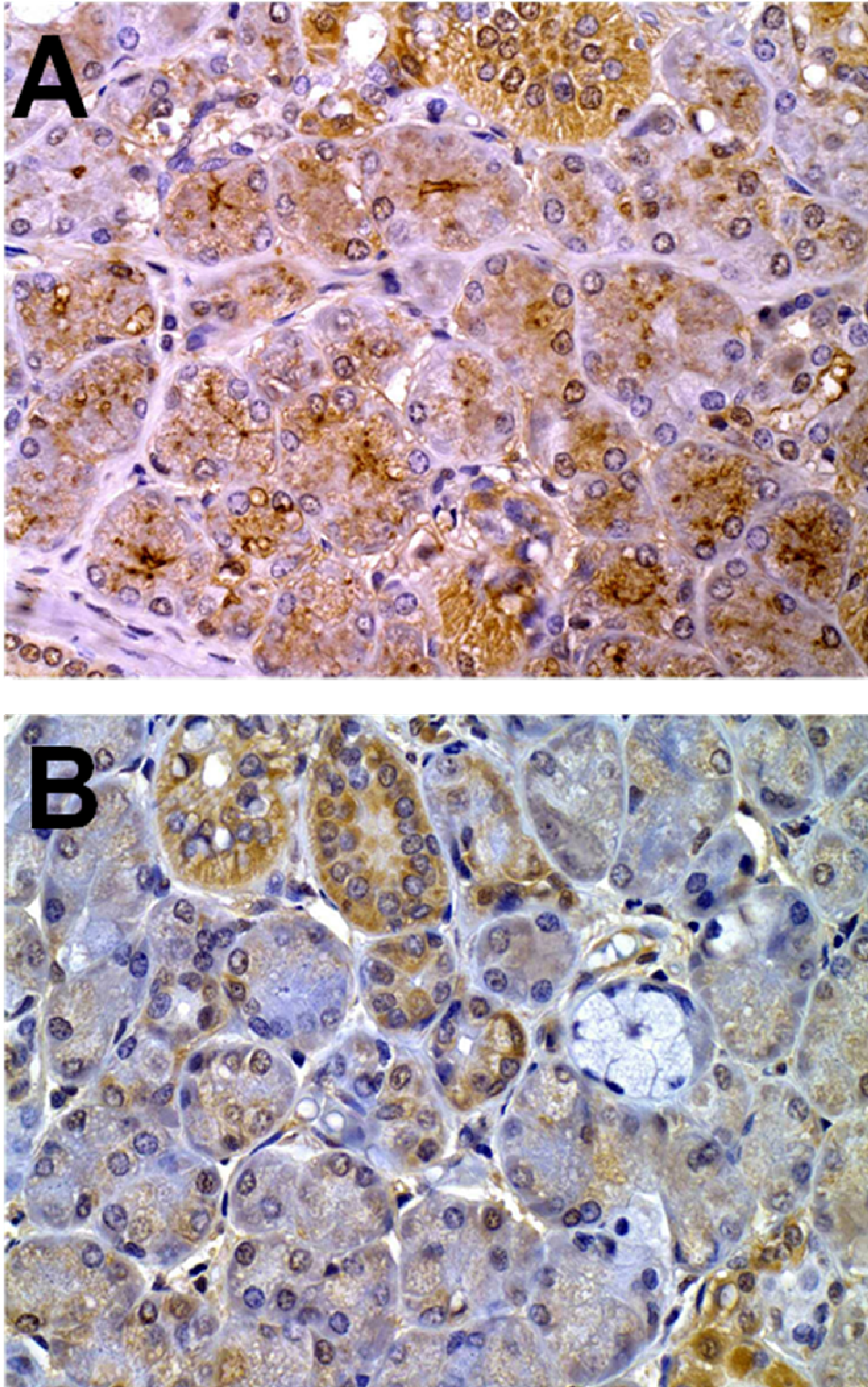


Abbildung 21. Patient 16579/00: Immunhistochemische Färbungen (A) mäßig positives AQP5-Signal an der apikalen Seite der Azinuszellen (B) Negativkontrolle (Originalvergrößerung, x60).

5 Diskussion

5.1 Sialadenose

Die Sialadenose oder Sialose ist definiert als eine rezidivierende, nicht entzündliche, nicht neoplastische, weiche, häufig schmerzlose, von der Nahrungsaufnahme unabhängige, in der Regel beidseitige Schwellung der großen Kopfspeicheldrüsen – insbesondere der Parotis [Seifert, 1996].

Auffällig ist eine Assoziation der Sialadenose mit einer Reihe von Erkrankungen, wobei insbesondere endokrine Erkrankungen, dystrophisch metabolische Störungen sowie die Einnahme bestimmter Medikamente zu nennen sind. Endokrine Sialadenosen findet man unter anderem beim Diabetes mellitus, wobei sie dort häufiger beim Diabetes des Alters als beim juvenilen Diabetes auftreten. Bei Sialadenosen im Rahmen von Typ I Diabetes können auch Schwellungen der Glandulae submandibulares beobachtet werden. Außerdem können Funktionsstörungen der Schilddrüse, der Keimdrüsen, der Hypophyse und der Nebennieren mit dem Auftreten einer Sialadenose assoziiert sein. Dystrophisch metabolische Sialadenosen treten bei chronischer Mangelernährung und Vitaminmangel auf. Die Ursachen dafür können vom chronischen Alkoholismus bis hin zu den psychiatrischen Erkrankungen einer Bulimie oder Anorexie reichen. Die Entwicklung einer Sialadenose ist auch unter der Einnahme bestimmter Medikamente beobachtet worden. Hierzu zählen vor allem Psychopharmaka, Antikonvulsiva, Antihypertensiva der Guanethidingruppe, alpha-Rezeptorblocker und Medikamente, die das sympathische und parasympathische Nervensystem beeinflussen [Seifert, 1996].

Die Sialadenose zählt nach tumorösen und entzündlichen Erkrankungen zu der dritthäufigsten pathologischen Veränderung der Speicheldrüsen [Donath, 1979]. Die Erkrankung ist nicht geschlechtsspezifisch. Der Altersgipfel der Erkrankung liegt zwischen dem 4. und 7. Lebensjahrzehnt. Die häufigste assoziierte Erkrankung ist der Alkoholismus. Außerdem finden sich bei 30 bis 80 Prozent der an Leberzirrhose erkrankten Patienten vergrößerte Speicheldrüsen [Mandel und Surattanont, 2002].

Histopathologisch finden sich charakteristischerweise keine Entzündungszellen, aber im Durchmesser bis zu dreifach vergrößerte Azinuszellen. Diese erreichen Größen bis zu 100 µm.

Eine klassische Einteilung nach Donath und Seifert unterscheidet Sialadenosen aufgrund von elektronenmikroskopischen Untersuchungen in helle, dunkle und gemischt körnige Sialadenosen ein [Donath und Seifert, 1975 und Satoh und Yoshihara, 2004].

Neben einer ausführlichen Anamnese unter Berücksichtigung der Eigenanamnese ist auch bei Sialadenosen wie bei allen Speicheldrüsenerkrankungen der nächste Schritt in der Diagnosefindung die klinische Untersuchung. Nach einer äußeren Inspektion, die auch den Gehörgang und das Trommelfell mit einbezieht, folgt eine Palpation der Speicheldrüsen und der Lymphabflusswege, bei der die Konsistenz, die Druckschmerzhaftigkeit und eine mögliche Verschieblichkeit des Tumors beachtet werden. Daraufhin schließt sich eine intraorale Inspektion an unter besonderer Beachtung der Speicheldrüsenausführungsgänge. Eine sichtbare Exkretion ist durch die Massage der entsprechenden Drüse provozierbar und zeigt eine freie Durchgängigkeit an.

Nach erfolgter Anamnese und klinischer Untersuchung ist die Sonographie ein wichtiges, preisgünstiges und für den Patienten schonendes Diagnostikum, welches bei der Entscheidung über eine möglicherweise notwendige weiterführende Spezialdiagnostik hilfreich ist. Die Sonographie ermöglicht eine Organzuordnung, außerdem ist ein Tumorausschluss möglich. Bei Sialadenosen findet man sonographisch charakteristischerweise Veränderungen, die das gesamte Drüsenparenchym einnehmen. Bei Prozessen, die Organgrenzen weit überschreiten, ist die Aussagekraft der Ultrasonographie eingeschränkt [Ußmüller, 2001].

Die Sialographie ist aufgrund der Invasivität, des größeren Zeitaufwandes und der höheren Kosten im Vergleich zur Sonographie ein weniger häufig eingesetztes Untersuchungsverfahren und im Wesentlichen besonderen Indikationen, unter anderem in der Diagnostik chronisch entzündlicher Erkrankungen, obstruktiver Erkrankungen und der Sialolithiasis, vorbehalten [Ußmüller, 2001]. Beim Vorliegen einer Sialadenose zeigt die Sialographie zarte engkalibrige Ausführungsgänge und in der Spätphase der Erkrankung das Bild des „entlaubten Winterbaumes“ [Seifert, 1996]. Mit Hilfe der Sialoszintigraphie ist eine Beurteilung der Parenchymfunktion und der Abflussverhältnisse möglich, wobei die Hauptindikation in der Diagnostik entzündlicher Erkrankungen und im Nachweis von funktionsfähigem Restdrüsengewebe nach Operationen oder nach Strahlentherapie liegt [Ußmüller, 2001].

Die Magnetresonanztomographie und die Computertomographie haben die gleiche Indikation wobei mittels MRT eine bessere Weichteildarstellung und mittels CT eine bessere Knochendarstellung (wichtig bei Infiltration des Knochens) erfolgt. In beiden bildgebenden Verfahren gibt es ähnlich zur Sonographie keine sicheren Malignitätskriterien. CT und MRT können präoperativ helfen, die Ausdehnung einer organübergreifenden Speicheldrüsenerkrankung abzuschätzen [Ußmüller, 2001].

Die Feinnadelaspirationszytologie stellt bei klinisch unklaren Prozessen eine sensitive und hoch spezifische Methode dar, mit deren Hilfe eine präoperative Dignitätsbeurteilung erlangt werden kann [Schröder et al., 2000 und Engzell et al., 1971]. In Abhängigkeit von Ergebnis und Güte ergibt sie eine begründete Entscheidungshilfe zur differenzierten Therapie [Gehrking, 2006]. Bei Sialadenosen ist das Vorkommen extrem großer Drüsenzellen und die hohe Vulnerabilität des Zytoplasmas kennzeichnend. Azinusbildung über 65 µm sind ein sicheres diagnostisches Kriterium für das Vorliegen einer Sialadenose [Seifert, 1996].

Eine Probebiopsie ist aufgrund eines möglichen hohen Rezidivrisikos beim Vorliegen z.B. eines pleomorphen Adenoms oder auch Karzinoms nur bei Verdacht auf eine lymphoproliferative oder lymphoepitheliale Erkrankung indiziert [Gross et al., 2004].

Bei Sialadenosen wird in einigen (seltenen) Fällen, in denen eine Mitbeteiligung der Speicheldrüsen des weichen Gaumens zu finden ist, als Alternative eine Biopsie dieser Drüsen zur histologischen Diagnosesicherung beschrieben [Mignogna et al., 2004].

Die Therapieempfehlungen in der Literatur bei Sialadenosen reichen von einer Aufklärung über die Harmlosigkeit der Erkrankung über medikamentöse Therapieoptionen bis hin zu operativen Maßnahmen. Übereinstimmend wird in den Veröffentlichungen immer wieder erwähnt, dass ein Erkennen und eine Behandlung von assoziierten Erkrankungen ein wichtiger Therapiebaustein sei. So zeigten Beobachtungen, dass bei an Bulimie erkrankten Patienten eine Speichelgrößenreduktion durch medikamentöse Behandlung einer oft begleitend auftretenden Depression bewirkt werden kann [Lavender, 1969]. Behandlungen mit Pilocarpin, einem direkten Parasympathomimetikum, führten ebenfalls bei an Bulimie Erkrankten zu einer Reduktion des Speicheldrüsenvolumens [Mehler und Wallace, 1993]. In einer Arbeit von Arold und Schätzle wurde die Wirkung eines Betablockers diskutiert [Arold und Schätzle, 1972].

Bezüglich einer operativen Therapie werden entgegengesetzte Ansichten vertreten. So sieht Berke et al. eine Indikation zur lateralen Parotidektomie aus kosmetischen und psychologischen Gründen als angemessen [Berke et al., 1985], wohingegen Mignogna einer Operation bei Patienten mit krankem Selbstwertgefühl und einer kranken Selbstwahrnehmung ein erhebliches Risiko beimisst [Mignogna et al., 2004]. Andere Autoren halten eine Parotidektomie für kontraindiziert [Rauch et al., 1987] und plädieren für nicht invasive Therapieoptionen [Mandel und Patel, 2002].

Vergleicht man die in der Literatur beschriebene Klinik einer Sialadenose mit der Klinik der Patienten, die sich zwischen 2000 und 2005 in der Universitäts-HNO-Klinik Marburg in ärztliche Behandlung befanden und bei denen das Vorliegen einer Sialadenose postoperativ

durch das Institut für Pathologie bestätigt wurde, so ist insbesondere bemerkenswert, dass sich auch hinter einer einseitigen Schwellung der Glandula parotis das Vorliegen einer Sialadenose verbergen kann. Eine fokale Sialadenose an sich scheint keinen eigenen Krankheitswert zu haben. Das für die immunhistochemischen Untersuchungen zur Verfügung stehende Gewebe mit dem Nachweis einer fokalen Sialadenose bzw. einer Sialadenose des umliegenden Speicheldrüsenorgans stammte von Patienten mit einer anderen Speicheldrüsenkrankung bzw. Erkrankung anderer Ätiologie des Kopf-Hals-Bereichs.

Ein wesentliches Charakteristikum von Sialadenosen sind die assoziierten Erkrankungen. Bei unseren Patienten fand sich ein breites Spektrum von dystrophisch metabolischen Störungen bis hin zu endokrinen Erkrankungen. Das Erkrankungsalter unserer Patienten lag im Vergleich zur Literatur eher etwas höher zwischen dem fünften und achten Lebensjahrzehnt. Übereinstimmend zeigte sich auch bei dem Patientenkollektiv dieser Arbeit keine geschlechtsspezifische Erkrankungshäufigkeit. Eine operative Therapie wurde bei allen vorstelligen Patienten durchgeführt. Bei einem der Patienten wurde im Vorfeld einer operativen Therapie eine Behandlung der assoziierten Erkrankung über Jahre durchgeführt.

5.2 Aquaporinwasserkanäle

Aquaporinwasserkanäle findet man aufgrund ihrer Funktion des Wassertransportes über Zellmembranen in besonders hoher Expression in den Gewebearten bzw. Epithelien, die an einem hohen Wasserumsatz beteiligt sind. Außer beim Menschen und Säugetieren kommen sie nahezu in jedem Organismus, auch bei Pflanzen und Mikroorganismen, vor. Neben der einfachen Diffusion stellen diese Proteine einen wichtigen Wassertransportweg über lipophile Zellmembranen dar [Agre *et al.*, 2002].

Ende der 1980er Jahre wurde durch die Arbeitsgruppe um P. Agre der erste Wasserkanal in der Zellmembran von Erythrozyten durch Zufall entdeckt [Denker *et al.*, 1988]. Obwohl man wusste, dass eine einfache Diffusion als alleinige Erklärung für den Wassertransport über Zellmembranen nicht ausreichte, war bis zu diesem Zeitpunkt kein anderer Mechanismus bzw. keine anderen Kanalproteine entdeckt worden. Schwierigkeiten in der Erforschung waren neben der Ubiquität von Wasser im Organismus die einfache Molekularstruktur von H_2O , die für eine chemische Modifikation wie das Anhängen photosensibler Seitenketten nicht ausreichend zugänglich ist. Die Änderung der Wasserpermeabilität einer Zellmembran durch Quecksilber oder organische Verbindungen, die Quecksilber enthalten, legten schon früh einen möglichen Proteincharakter von Wasserkanälen nahe. Da $HgCl_2$ jedoch mit vielen Proteinen interagiert, war auch auf diesem Weg keine Spezifizierung möglich. Bei der

Isolierung eines Proteinbestandteils des Rhesusfaktors von Blutgruppenantigenen fand man schließlich ein 28kDa schweres Polypeptid, von dem man zunächst annahm, dass es ein proteolytisches Fragment des Rhesusfaktors sei. Weitere biochemische Charakterisierungen zeigten jedoch, dass es sich um ein eigenständiges Protein handelte. Dieses Protein wurde als der erste Wasserkanal zunächst unter dem Namen CHIP28 (channel-like integral protein of 28 kDa) bekannt. Nachdem verwandte Proteine mit ähnlicher Funktion identifiziert wurden, etablierte sich der Name Aquaporine als Bezeichnung für die wachsende Proteinfamilie. Gegenwärtig sind mehr als 10 Isoformen charakterisiert und näher untersucht worden [Borgnia et al., 1999].

Tabelle 6. Aquaporinwasserkanäle. Lokalisation und mögliche Funktion von AQP [modifiziert und bearbeitet nach Matsuzaki et al., 2002].

	Lokalisation	mögliche Funktion
AQP0	Linsenfaserzelle	
AQP1	Erythrozyten Kapillarendothel Tubulus der Niere (proximaler Tubulus, absteigender Anteil der Henleschleife) Gallenblase	Wassertransport über Gefäße Harnkonzentrierung Modifikation der Galle
AQP2	Sammelrohr (Niere) Samenleiter	Konzentrierung der Spermienflüssigkeit
AQP3	Sammelrohr (Niere) Harntrakt Respirationstrakt Magen- und Darmtrakt Epidermis der Haut Kornea Konjunktiven Meningen	Aufrechterhaltung einer Osmolarität Transport von Rückenmark- und Hirnwasser
AQP4	Sammelrohr (Niere) Parietalzellen des Magens Respirationstrakt Meningen Gliazellen Retina Skelettmuskel	Magensäuresekretion Regulierung des Hirnvolumens
AQP5	Speicheldrüse Tränendrüse Alveolarzellen Typ I Kornea	Speicheldrüsensekretion Tränensekretion Wassertransfer zwischen Alveolarraum und Luftraum
AQP6	Sammelrohr (Niere)	

AQP7	Proximaler Tubulus der Niere Samenkanälchen	
AQP8	Proximaler Tubulus der Niere Samenkanälchen Duodenum, Jejunum, Kolon Gallengänge Azinuszellen des Pankreas	Reifung der Spermien Sekretion Pankreassekret
AQP9	Leydig Zellen Nebenhoden Leber	
AQP10	Dünndarm	

Aquaporine sind kleine hydrophobe Integralmembranproteine, die aus ca. 270 Aminosäuren bestehen. In jedem Monomer von $\pm 30\text{kDa}$ findet man sechs Transmembrandomänen.

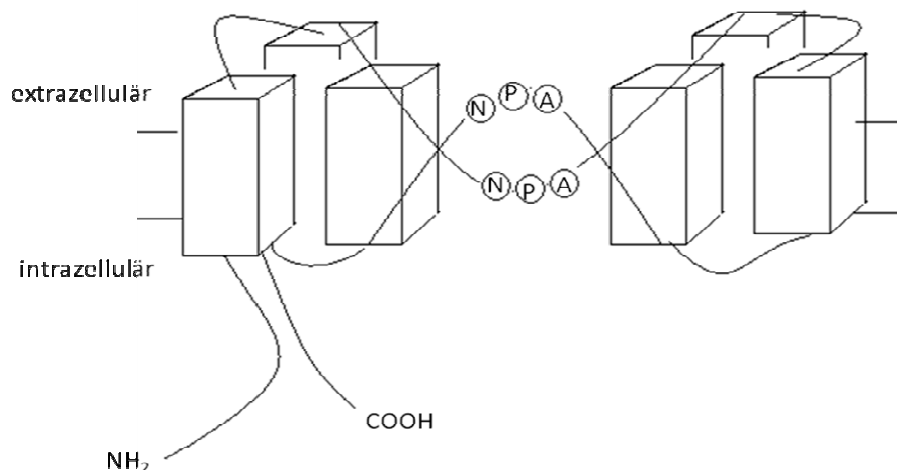


Abbildung 22. Stundenglasmodell eines Aquaporinwasserkanals. AQP-Subunit bestehend aus sechs Transmembrandomänen, drei extrazellulären und zwei intrazellulären Schleifen (modifiziert nach Agre, 2002).

Durch diese Anordnung werden drei extrazelluläre bzw. zwei intrazelluläre Schleifen aufgeworfen. Die für AQPs charakteristische Aminosäuresequenz (Asparagin – Prolin – Alanin) findet sich in der ersten intrazellulären und der dritten extrazellulären Schleife. Gemäß dem „Stundenglasmodell“ verbinden sich diese beiden Schleifen innerhalb der Lipiddoppelschicht und formen so eine hydrophile Pore für den Wassertransport durch die hydrophobe Lipidmembranschicht. In der Plasmamembran setzten sich Aquaporine als Tetramer zusammen, wobei jedes Monomer einen Wasserkanal enthält. Eine selektive

Wasserdurchlässigkeit wird durch die vorgegebene Größe der Pore und durch die Orientierung des Asparagin innerhalb der (bereits oben erwähnten) spezifischen Aminosäuresequenz NPA gewährleistet. Diese ist die Voraussetzung für hydrophile Bindungsinteraktionen [Agre et al., 2002, Borgnia et al., 1999 und Kozono et.al., 2002].

In menschlichen Speicheldrüsen wurde bisher über eine sichere Expression und Lokalisation der Aquaporinwasserkanäle AQP1 und AQP5 berichtet. Die Datenlage bezüglich des Vorkommens der Aquaporinwasserkanäle AQP3, AQP4, AQP6, AQP7 und AQP8 ist gegensätzlich [Delporte und Steinfeld, 2006]. Eine sichere Expression von AQP3 und ein immunhistochemischer Nachweis der Lokalisation an der basolateralen Plasmamembranseite wurden bisher von Gresz et al. beschrieben [Gresz et al., 2001]. Übereinstimmend scheinen die Aquaporinwasserkanäle AQP4, AQP6, AQP7 und AQP8 keine Funktion im Rahmen der Speichelproduktion zu haben [Delporte und Steinfeld, 2006]. AQP1 findet sich sowohl in Endothelzellen der Gefäße als auch in Myoepithelzellen. Die Funktion in den Myoepithelzellen, die vor allem kontraktile Funktionen haben, ist bisher jedoch nicht näher verstanden. AQP3 ist an der basolateralen Membranseite von Azinuszellen lokalisiert. Über eine gesicherte Funktion bei der Speichelproduktion liegen bisher keine Daten vor. AQP5 findet man überwiegend an der apikalen Plasmamembranseite sowohl von serösen als auch mukösen Azinuszellen. Zur näheren Charakterisierung von AQP5 wurden sowohl in vivo als auch in vitro Untersuchungen durchgeführt. AQP5-Wasserkanäle sind an der Speichelproduktion beteiligt. Versuche an AQP5-knockout-Mäusen zeigten, dass diese nach Stimulation mit Pilocarpin einen hypertonen, viskosen, in der Menge verminderten Speichel produzieren. Ein Einfluss auf die Proteinsekretion konnte nicht gezeigt werden [Ma et al., 1999]. In vitro Untersuchungen haben gezeigt, dass eine vermehrte Speichelproduktion nach Stimulation mit Pilocarpin nicht durch einen kurzfristigen vermehrten Einbau von AQP5-Wasserkanälen in die Plasmamembran einhergeht. Vielmehr konnte auf subzellulärer Ebene eine Art Clusterbildung im Bereich der Mikrovilli und eine am ehesten damit einhergehende vermehrte Speichelproduktion beobachtet werden [Gresz et al., 2004]. Außerdem scheinen AQP5-Wasserkanäle neben der oben erwähnten Funktion bei der Speicheldrüsenproduktion an der Zellvolumenregulation beteiligt zu sein. In Versuchen mit AQP5-knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit einer Speicheldrüsenazinuszelle, das Zellvolumen unter nicht osmotischen Umgebungsbedingungen zu ändern, deutlich herabgesetzt ist [Krane et al., 2001].

5.3 Ätiopathologie von Sialadenosen

Die Sialadenose ist eine Erkrankung bisher ungeklärter Ätiologie. Eine der führenden Hypothesen zur Ätiopathologie von Sialadenosen bezieht sich auf Dysfunktionen des vegetativen Nervensystems.

Bei histomorphologischen Untersuchungen von Sialadenosen beobachtete Seifert 1975 degenerative Veränderungen von Nervenenden und Myoepithelzellen im Rahmen einer demyelinisierenden Polyneuropathie [Donath und Seifert, 1975]. Diese Beobachtungen wurden unter anderem durch Tierexperimente gemacht. Nach Einwirkungen von Antihypertensiva (z.B. Guanacline) wurden degenerative Veränderungen des terminalen vegetativen Nervensystems beobachtet. Diese zytotoxische Axonschädigung wurde als Ursache für die gestörte Azinussekretion gesehen. Eine gestörte Azinussekretion könnte zu einem Anschwellen des Zytoplasmas mit konsekutiver Vergrößerung der Azinidurchmesser führen [Donath und Seifert, 1973].

Satoh und Yoshihara beschrieben in neueren elektronenmikroskopischen Untersuchungen strukturelle Veränderungen an den terminalen Nervenendigungen als weniger relevant, wiesen in ihren Untersuchungen jedoch auf eine mögliche funktionelle Störung des vegetativen Nervensystems in der Pathogenese von Sialadenosen hin. Eine Störung der Speichelsekretion könnte zu einem Anschwellen der Azinuszellen führen. Bei Sialadenosen unterschiede sich die Verteilung der kohlenhydrathaltigen Makromoleküle in den Sekretgranula im Vergleich zu Parotisnormalgewebe. Außerdem fanden sich Hinweise auf einen gestörten Ablauf der intrazellulären Amylasesynthese. Amylase wurde nicht mehr nur in den elektronendichten Anteilen der Sekretgranula gefunden sondern auch in anderen Bereichen der Azinuszelle [Satoh und Yoshihara, 2004].

Neben diesen Beobachtungen und indirekten Hinweisen auf eine mögliche Dysfunktion des vegetativen Nervensystems wurde in Versuchen die Wirkung einer direkten Beeinflussung des vegetativen Nervensystems und deren Auswirkung auf Speicheldrüsen untersucht. An Tiermodellen wurde nach Stimulation mit Katecholaminderivaten, z.B. Isoproterenol, einer β -adrenergen Substanz, ein Anschwellen der Speicheldrüsen beobachtet. In histologischen Untersuchungen zeigte sich sowohl eine auf die Stimulation folgende Hyperplasie als auch Hypertrophie der Speicheldrüsen. Auch eine im Tiermodell erzeugte Parotisschwellung durch chronischen Nikotinkonsum wurde über eine vermehrte Nebennierenrindenaktivität mit sekundärer Aktivierung des sympathischen Nervensystems erklärt [Seifert, 1996].

Eine Veränderung der Proteinsekretion wurde im Tiermodell auch nach einer Behandlung mit Antidepressiva (z.B. Amitriptylin) beobachtet. Dies ist möglicherweise durch eine anticholinerge, parasympatholytische Wirkung zu erklären [Chilla et al., 1977].

Neben der möglichen Rolle der Veränderungen des autonomen Nervensystems wurde in der Literatur bisher außerdem die Frage einer funktionellen Bedeutung der Myoepithelzelldegeneration in der Ätiopathologie von Sialadenosen diskutiert. Eine neuere Arbeit untersuchte, ob eine sekundäre Azinusvergrößerung als Folge einer primären funktionellen Insuffizienz der Myoepithelzellen, denen insbesondere in Speicheldrüsen eine besondere Stütz- und Stabilisierungsfunktion zugeschrieben wird, auftritt. Dabei zeigte sich eine tendenziell positive Korrelation zwischen dem Ausmaß der Azinusvergrößerung und dem Verlust an Myofilamenten. Der Befund einer in anderen Untersuchungen nachgewiesenen reaktiven Arbeitshypertrophie von Myoepithelzellen bei Druckerhöhung ist ein weiteres Indiz für die Hypothese einer primären Myoepithelinsuffizienz mit sekundärer Azinusvergrößerung [Rath, 2007].

Ob die bisherigen führenden Hypothesen zur Pathogenese von Sialadenosen ausreichend die Entwicklung dieser Krankheitsentität erklären, wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht abschließend untersucht. Aufgrund von Untersuchungsergebnissen unserer Arbeitsgruppe muss davon ausgegangen werden, dass bei der Entwicklung einer Sialadenose noch andere, bisher wenig beachtete, Mechanismen berücksichtigt werden müssen.

Ein kürzlich veröffentlichter Fallbericht unserer Arbeitsgruppe mit dem Titel „*Sialadenosis of the major salivary glands in a patient with central diabetes insipidus – implications of aquaporin water channels in the pathomechanism of sialadenosis*“ [Mandic et al., 2005] schreibt Aquaporinwasserkanälen eine mögliche Schlüsselrolle beim Pathomechanismus der Entstehung von Sialadenosen zu.

Die Patientin in der oben angeführten Kasuistik, eine 24-jährige Frau, war an zentralem Diabetes insipidus erkrankt und entwickelte während einer Zeitperiode mit erhöhter ADH-Applikation eine beidseitige massive Schwellung in der Ohrspeicheldrüsenregion. Nach Sonographie, Kernspintomographie, Sialographie, laborchemischer Untersuchung und feingeweblicher Probeentnahme wurde die Diagnose Sialadenose gestellt [Mandic et al., 2005].

Innerhalb der großen Aquaporinwasserkanalfamilie wurde sowohl bei AQP2 als auch bei AQP5 ein funktionsregulierender Einfluss durch Hormone beschrieben. Dies steht möglicherweise auch im Zusammenhang mit der sehr nahen phylogenetischen Verwandtschaft zwischen AQP2 und AQP5 [Borgnia et al., 1999].

AQP2, das in den Sammelrohren der Nieren isoliert wurde, unterliegt einem regulierenden Einfluss durch das im Hypophysenvorderlappen gebildete Hormon ADH. Bei Anwesenheit von ADH wird AQP2 vermehrt in die apikale Membran der Sammelrohre eingebaut; dies führt zur Wasserretention [Borgnia et al., 1999]. AQP5 ist an der apikalen Membran von Azinuszellen der Speicheldrüsen lokalisiert [Agre et al., 2002], wo es an der Speichelproduktion beteiligt ist [Lee et al., 1996]. Der Einbau von AQP5 wird ebenfalls durch Neurotransmitter reguliert. Beschrieben ist, dass der Einfluss von Acetylcholin, Epinephrin und Muskarinrezeptoragonisten den Einbau von AQP5 in die apikale Plasmamembran der Azinuszelle reguliere [Ishikawa und Ishida, 2000].

Bei beobachteter Entwicklung einer Sialadenose unter Hormonsubstitution (ADH) bei einer an Diabetes insipidus erkrankten Patientin und bei bekanntem hormonregulierenden Einfluss auf Aquaporinwasserkanäle stellte sich die Frage einer Beteiligung dieser bei der Entstehung der Sialadenose. Mittels immunhistochemischen Färbungen von Paraffinschnitten mit AQP-spezifischen Antikörpern konnte in der oben genannten Kasuistik ein verstärktes AQP5-Signal an der apikalen Seite der Zellen der erkrankten Speicheldrüse im Vergleich zu normalem Speicheldrüsengewebe beobachtet werden. Für andere Aquaporinwasserkanäle konnte kein vermehrtes Signal nachgewiesen werden [Mandic et al., 2005].

In den immunhistochemischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnte in einem größeren Patientenkollektiv ebenfalls ein spezifisches AQP5-Signal an der apikalen Membran der Azinuszellen von Sialadenosen detektiert werden (vergleiche Abbildungen 11-19). In der ersten Patientengruppe zeigte es sich in ca. 80% deutlich positiv. AQP2 konnte erwartungsgemäß in Speicheldrüsennormalgewebe und Sialadenosen nicht nachgewiesen werden. Färbungen auf AQP5 in Parotisnormalgewebe waren regelmäßig schwach positiv.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen sowohl des Fallberichtes unserer Arbeitsgruppe als auch die oben aufgeführten Ergebnisse geben aufgrund des deutlichen Signalunterschiedes von AQP5 zwischen Parotisnormalgewebe und Sialadenosen Hinweise auf unterschiedliche Expressionslevel von AQP5 und legen eine Beteiligung von Aquaporinwasserkanälen in der Pathogenese von Sialadenosen nahe.

Neben der (semi-)quantitativen unterschiedlichen Signalstärke des AQP5-Signals zeigt sich bei Sialadenosen im Vergleich zu Parotisnormalgewebe und anderen Erkrankungen der Ohrspeicheldrüsen (z.B. Sjögren-Syndrom) eine unterschiedliche Verteilung des AQP5-Signals. In Sialadenosen findet man eine diffuse Verteilung des AQP5-Signals im apikalen Bereich einer Azinuszelle. Diese diffuse Verteilung könnte für eine vermehrte Lokalisation in apikalen intrazytoplasmatischen Vesikeln sprechen. In Tierversuchen wurde eine

Translokation von AQP5 von intrazytoplasmatischen Vesikeln in die apikale Plasmamembran nach Stimulation mit Isoproterenol beschrieben. Eine Aussage über eine kurzfristige oder länger andauernde Translokalisierung während einer Stimulation zur Speichelsekretion kann jedoch noch nicht gemacht werden [Delporte et al., 2006]. Zur näheren Quantifizierung des bei den immunhistochemischen Untersuchungen detektierten Signalunterschieds zwischen Sialadenosen und Parotisnormalgewebe wäre es notwendig, weiterführender Methoden wie die quantitative PCR anzuwenden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen könnten helfen, die beobachteten Verteilungsunterschiede von AQP5 zwischen Sialadenosen und anderen Erkrankungen der Ohrspeicheldrüse auf subzellulärer Ebene zu untersuchen.

Ein wesentliches Kriterium der histopathologischen Diagnosesicherung von Sialadenosen ist die bis zu dreifach vergrößerte Azinuszelle im Speicheldrüsengewebe. Interessanterweise konnten in unseren immunhistologischen Untersuchungen nur Hinweise auf eine Beteiligung von AQP5 gefunden werden. AQP5 hat in Speicheldrüsenzellen eine wichtige Funktion in der Zellvolumenregulation. Krane et al. konnten an AQP5-knockout-Mäusen zeigen, dass die Fähigkeit zur Zellvolumenregulation bei diesen Tieren deutlich herabgesetzt ist [Krane et al., 2001]. In ähnlicher Weise könnte man sich vorstellen, dass eine vermehrte Expression von AQP5 mit einer Volumenänderung der Azinuszellen vergesellschaftet ist. Auch unsere morphometrischen Untersuchungen zeigen eine deutliche Vergrößerung der Azinuszellen bei Sialadenosen im Vergleich zu Parotisnormalgewebe (vergleiche auch Abbildungen 10 und 11).

Betrachtet man die assoziierten Erkrankungen der Sialadenosepatienten dieser Arbeit, so ist bemerkenswert, dass bei keinem der Patienten eine direkte Hormonersatztherapie, ähnlich dem Fall der an Diabetes insipidus erkrankten Patientin, durchgeführt wurde. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass zusätzlich zu einer möglichen direkten Beeinflussung der AQP5-Expression andere indirekte Mechanismen bei der Entstehung von Sialadenosen beteiligt sind.

Unsere Arbeitsgruppe vermutet im oben erwähnten Fallbericht einen Zusammenhang der AQP5-Expressionsvariabilität mit dem ADH-Serumspiegel bzw. dem Körperwasserhaushalt. Dieser mögliche Pathomechanismus könnte ebenfalls die Entstehung von Sialadenosen im Rahmen eines schlecht eingestellten Diabetes mellitus, bei dem es aufgrund einer Polyurie zu hohen ADH-Konzentrationen kommt, erklären [Fujisawa et al., 1996]. Ein anderer Erklärungsansatz könnte z. B. eine Hochregulation der AQP5-Expression infolge eines chronischen Flüssigkeitsverlustes bei übermäßiger Diurese sein. Dies kann die Entstehung von Sialadenosen sowohl bei Diabetes insipidus, Diabetes mellitus als auch bei Patienten mit

Alkoholabusus, welche eine verminderte ADH-Konzentrationen und eine erhöhte Diurese aufgrund einer alkoholabhängigen Hemmung der ADH-Sekretion zeigen, erklären [Mandic *et al.*, 2005]. Die durchgeführten immunhistochemischen Färbungen können letztendlich nur Hinweise auf die Beteiligung von AQP5 bei der Pathogenese von Sialadenosen geben. Nachfolgende Untersuchungen sollten darauf abzielen, diesen Sachverhalt weiter zu untersuchen unter besonderer Beachtung des Einflusses von ADH-Serumspiegel und Körperwasserhaushalt.

Unsere Schlussfolgerungen bezüglich einer Beteiligung von Aquaporinwasserkanälen beruhen auf der Interpretation der immunhistochemischen Färbungen mit deutlichen Unterschieden in der Signalintensität für AQP5 in Sialadenosen im Vergleich zu Parotisnormalgewebe.

Die Ergebnisinterpretation hinsichtlich der Signalstärke und Spezifität der immunhistochemischen Färbungen ist neben möglichen technischen Problemen, die zu einer fehlenden Demaskierung gesuchter Antigene führen können, auch durch die fehlende Objektivität der Signalstärkenbewertung erschwert. Eine objektive Quantifizierung kann bei entsprechenden technischen Voraussetzungen, z.B. durch die Verwendung radioaktiv markierter oder fluoreszierender Antikörper oder nach Gewinnung von RNA mittels quantitativer PCR, geschehen. In dieser Arbeit erfolgt die Bewertung der Signalstärke durch subjektiven Vergleich. Schon beim Trockenvorgang des in Paraffin eingebetteten und auf einen Objektträger aufgetragenen Gewebes kann es durch zu hohe Temperaturen zur Antigenzerstörung und damit zu nur schwach positiven oder falsch negativen Ergebnissen kommen. Eine unvollständige Entparaffinierung verhindert eine Bindung des Antikörpers an das gesuchte Epitop. Treten Fehler bei der Hitzedemaskierung auf, werden die durch die Formalinfixierung entstandenen Proteinvernetzungen nur ungenügend oder gar nicht getrennt, so dass eine spezifische Antikörper-Antigen-Reaktion nicht möglich ist. Falsch positive Ergebnisse können aufgrund einer unvollständigen Blockade der endogenen Enzyme auftreten. Trotz der für diese Arbeit erfolgten Optimierung und Modifizierung des Färbeprotokolls und einer möglichst sorgfältigen Bewertung der Signalintensitäten der detektierten Antigene, fallen innerhalb des Gesamtpatientenkollektives erhebliche Unterschiede in der Aquaporin-Wasserkanal-Dichte auf. Die erste Patientengruppe mit klinisch manifester Sialadenose zeigte eine deutliche AQP5-Expression. In der zweiten Gruppe, in der die Sialadenose nur ein histopathologischer Zufallsbefund war, zeigte sich eine eher geringe Expression. Eine mögliche Erklärung ist, dass in den untersuchten Paraffinschnitten das gleichzeitige Vorhandensein von normalen Azini häufiger als bei

manifestester Sialadenose ist. Im Vergleich mit Parotisnormalgewebe konnte jedoch in beiden Patientengruppen ein deutlicher Signalunterschied gefunden werden.

Eine möglichst große Sicherheit in der Antigendemaskierung und Antigendetektierung ist eine wesentliche Voraussetzung in der Interpretation immunhistochemischer Färbungen. So zeigte die Forschungsgruppe um Beroukas [Beroukas *et al.*, 2001] bei der Untersuchung der Lokalisation von AQP5 in Speicheldrüsen von Patienten, die an einem primären Sjögren-Syndrom erkrankt waren, dass sowohl die Signaldichte als auch die Lokalisation bei Gesunden und Erkrankten identisch ist, im Gegensatz zu der Arbeitsgruppe um Steinfeld [Steinfeld *et al.*, 2001], die eine Änderung der Lokalisation von AQP5 bei Erkrankten mit einer relativ gleichmäßigen Verteilung von AQP5 über die Plasmamembran mit jedoch überwiegend basolateraler Lokalisation nachwiesen. Als mögliche Ursache wurde eine unzureichende Antigendemaskierung diskutiert.

6 Zusammenfassung

Die Sialadenose ist definiert als eine nicht entzündliche, meist beidseitige, häufig schmerzlose, rezidivierende Schwellung der Ohrspeicheldrüse. Erstmals durch Rauch 1956 als eigene Krankheitsentität definiert, wurde der Begriff 1972 durch die WHO als Bezeichnung für die bis dahin übliche deskriptive Beschreibung der „asymptomatischen Speicheldrüsenanschwellung“ vorgeschlagen und etabliert. Neben entzündlichen und tumorösen Erkrankungen zählen Sialadenosen zu den dritthäufigsten Erkrankungen der Ohrspeicheldrüse. Sialadenosen sind häufig assoziiert mit endokrinen, metabolisch-dystrophischen und neurogenen Erkrankungen oder der Einnahme bestimmter Medikamente u.a. Antihypertensiva und Psychopharmaka. Histologisch ist neben dem Fehlen jeglicher Entzündungszeichen eine Vergrößerung der Azinuszelle auf das Doppelte bis Dreifache des Normalwertes kennzeichnend. Frühere Untersuchungen vermuteten eine Polyneuropathie als zugrundliegende Ursache, wobei der exakte Pathomechanismus jedoch weiterhin unklar ist.

Ende der 1980iger Jahre wurde der erste Aquaporinwasserkanal durch Agre und Mitarbeiter entdeckt. Bis heute wurden mehr als 10 Wasserkanäle vor allem in Epithelien und in sekretorischen, am Wasserhaushalt beteiligten Zellen entdeckt und charakterisiert. Unsere Arbeitsgruppe beobachtete die Entwicklung einer Sialadenose bei einer an Diabetes insipidus erkrankten Frau während einer Zeit erhöhter ADH-Applikation. Da ADH die Expression von AQP2 in der Niere steuert, lag die Vermutung einer Beteiligung von Aquaporinwasserkanälen bei der Pathogenese von Sialadenosen nahe. Immunhistochemische Färbungen zeigten im Parotisgewebe dieser Erkrankten eine beträchtliche Zunahme der Expression von AQP5 im Vergleich zu Parotisnormalgewebe. In der vorliegenden Arbeit wurde an einem erweiterten Patientenkollektiv eine mögliche pathogenetische Rolle von Aquaporinwasserkanälen bei Sialadenosen näher untersucht. Neben morphometrischen Untersuchungen wurden immunhistochemische Untersuchungen auf AQP2 und AQP5 durchgeführt. In die immunhistochemischen Untersuchungen wurden nur solche Speicheldrüsen miteingeschlossen, welche postoperativ durch das Institut für Pathologie als Sialadenose befundet worden waren. Unter Berücksichtigung von Signalstärke und Lokalisation konnte AQP2 in Speicheldrüsen (erwartungsgemäß) nicht nachgewiesen werden. Übereinstimmend mit den Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte im gesamten Patientenkollektiv ein spezifisches AQP5-Signal in Sialadenosen nachgewiesen werden. Im Parotisnormalgewebe war AQP5 regelmäßig, jedoch nur schwach darstellbar. Aufgrund der unterschiedlichen Signalintensität kann auf eine unterschiedliche Expression von AQP5 in Sialadenosen im

Vergleich zu Parotisnormalgewebe geschlossen werden. Die gleichzeitig zu den immunhistochemischen Färbungen durchgeführten klinischen Untersuchungen legen aufgrund der assoziierten Erkrankungen nahe, dass das bereits durch unsere Arbeitsgruppe gefundene verstärkte AQP5-Signal bei Sialadenosen bei einer Patientin mit Diabetes insipidus nicht auf diese Erkrankung beschränkt ist, sondern bei einer Vielzahl von assoziierten Erkrankungen auftritt. Neben den (semi-)quantitativen Unterschieden des AQP5-Signals zeigt sich bei Sialadenosen im Vergleich zu Parotisnormalgewebe und anderen Erkrankungen der Ohrspeicheldrüsen (z.B. Sjögren-Syndrom) eine unterschiedliche Verteilung des AQP5-Signals. In Sialadenosen findet man eine diffuse Verteilung des AQP5-Signals im apikalen Bereich einer Azinuszelle. Im Parotisnormalgewebe und bei erkranktem Ohrspeicheldrüsenngewebe (z.B. Sjögren-Syndrom) ist das AQP5-Signal streng im Bereich der apikalen Plasmamembran lokalisiert.

Ein möglicher pathophysiologischer Erklärungsansatz für eine Mitbeteiligung von Aquaporinwasserkanälen in der Pathogenese von Sialadenosen ist, dass Störungen des Körperwasserhaushaltes zu Veränderungen der AQP-Expression führen. Aufgrund dieser Veränderungen könnten Störungen der Zellvolumenregulation eintreten, die zur typischen Klinik einer Sialadenose mit beidseitiger Drüsenschwellung beitragen.

Um die Pathogenese von Sialadenosen besser zu verstehen, sind weiterführende Untersuchungen notwendig. Zur genauen Quantifizierung des beobachteten Signalunterschiedes von AQP5 in Sialadenosen im Vergleich zu normalem Speicheldrüsenngewebe sollten Untersuchungen mittels quantitativer PCR durchgeführt werden. Subzelluläre Verteilungsunterschiede der Aquaporinwasserkanäle könnten elektronenmikroskopisch weiterführend erforscht werden.

7 Literaturverzeichnis

- Agre, P., L.S. King, et al. (2002) "Aquaporin water channels - from atomic structure to clinical medicine." *Journal of Physiology* **542**(1): 3-16.
- Arold, R., W. Schätzle (1973) "Die "Experimentelle Sialadenose" und ihre Beeinflussung durch β -Rezeptoren-Blocker." *Arch Klin Exp Ohren- Nasen- Kehlkopfheilkunde* **203**(4): 274-278.
- Berke, G.S., T.C. Calcaterra (1985) "Parotid hypertrophy with bulimia: a report of surgical management." *Laryngoscope* **95**(9): 597-598.
- Beroukas, D., J. Hiscock et al. (2001) "Subcellular distribution of aquaporin 5 in salivary glands in primary Sjögren's syndrome." *Lancet* **358**: 1875-1876.
- Borgnia, M., S. Nielsen, et al. (1999) "Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels." *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 425-458.
- Chilla, R., G. Hoffmann, C. Arglebe (1977) „Die stimulatorische Proteodyschylie“ in der Amitriptylin (Laroxyl) behandelten Rattenparotis. Tierexperimentelle Untersuchungen über die Auswirkung einer antidepressiven Pharmakotherapie auf die Ohrspeicheldrüsen.“ *Arch. Oto-Rhino-Laryng.* **217**: 61-67.
- Delporte, C., S. Steinfeld (2006) "Distribution and roles of aquaporins in salivary glands." *Biochimica et Biophysica Acta* **1758**: 1061-1070.
- Denker, B.M., B.L. Smith, et al. (1988) „Identification, purification and partial characterization of a novel Mr 28000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules.“ *J Biol Chem* **263**: 15634-15642.
- Donath, K., G. Seifert (1973) „Parotis-Sialadenose nach Langzeittherapie mit Antihypertensiva (Guanaciline).“ *Virchows Arch Abt A Path Anat.* **360**: 33-44.

- Donath, K., G. Seifert (1975) "Ultrastructural studies of the parotid glands in sialadenosis." *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* **365**(2): 119-135.
- Donath, K. (1979) "Swellings of the cheek form sialosis." *HNO* **27**: 113-118.
- Engzell, U., Esposti, D.L., et al. (1971) "Investigation on tumour spread in connection with aspiration biopsy." *Acta Radiol* **10**: 385-398.
- Fujisawa, I., N. Murakami, et al. (1996) "Plasma and neurohypophyseal content of vasopressin in diabetes mellitus." *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**(8):2805-2809.
- Gehrking, I. (2006) „Stellenwert der präoperativen Aspirationszytologie bei der Chirurgie der Glandula parotidea unter besonderer Berücksichtigung der gutartigen Speicheldrüsentumore.“ Dissertation aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde Lübeck.
- Gresz, V., T.H. Hurley, et al. (2001) "Identification and localization of aquaporin water channels in human salivary glands." *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **281**(1): 247-254.
- Gresz, V., T.H. Kwon, et al. (2004) "Immunolocalization of AQP-5 in rat parotid and submandibular salivary glands after stimulation or inhibition of secretion in vivo." *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **287**(1): 151-161.
- Gross, M., Ben-Yaacov, et al. (2004) "Role of open incisional biopsy in parotid tumors." *Acta Otolaryngol* **124**: 758-760
- Ishikawa, Y. and H. Ishida (2000) "Aquaporin water channel in salivary glands." *Jpn. J. Pharmacol.* **83**(2): 95-101.
- Krane, C.M., J.E. Melvin, et al. (2001) "Salivary acinar cells from aquaporin 5-deficient mice have decreased membrane water permeability and altered cell volume regulation." *J. Biol. Chem.* **276**(26): 23413-23420.

- Kozono, D., M. Yasui, et al. (2002) "Aquaporin water channels: atomic structure molecular dynamics meet clinical medicine." *J. Clin. Invest.* **109**(11): 1395-1399.
- Lavender S., (1969) "Vomiting and parotid enlargement." *Lancet* **1** (7591): 426.
- Lee, M.D., K.Y. Bhakta, et al. (1996) "The human Aquaporin-5 gene. Molecular characterization and chromosomal localization." *J. Biol. Chem.* **271**(15): 8599-604.
- Ma, T., Y. Song, et al. (1999) "Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aqp-5 water channels." *J. Biol. Chem.* **274**: 20071-20074.
- Mandel, L. and S. Patel (2002) „Sialadenosis associated with diabetes mellitus: a case report." *J. Oral. Maxillofac. Surg.* **60**(6): 696-698.
- Mandel, L. and F. Surattanont (2002) „Bilateral parotid swelling: a review." *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **93**(3): 221-237.
- Mandic, R., A. Teymoortash, et al. (2005) "Sialadenosis of the major salivary glands in a patient with central diabetes insipidus--implications of aquaporin water channels in the pathomechanism of sialadenosis." *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* **113**(4): 205-207.
- Matsuzaki, T., Y. Tajika, et al.(2002) „Aquaporins: a water channel family." *Anat. Sci. Int.* **77**(2): 85-93.
- Mehler, P.S., J.A. Wallace (1993) "Sialadenosis in bulimia. A new treatment." *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **119**(7): 787-788.
- Mignogna, M.D., S. Fedele, et. al. (2004) "Anorexia/bulimia-related sialadenosis of palatal minor salivary glands." *J. Oral Pathol. Med.* **33**: 441-442.
- Netter, F.H. (2000) "Atlas der Anatomie des Menschen." Zweite, erweiterte Ausgabe; Stuttgart, New York: Thieme
- Noll und Schaub-Kuhnen (2000) „Praxis der Immunhistochemie." Urban & Fischer.

- Rath, C. (2007) "Morphologische Untersuchungen zur formalin Pathogenese der Sialadenose menschlicher Speicheldrüse." Dissertaion aus dem pathologischen Institut der LMU München.
- Rauch, S.D., D.B. Herzog (1987) „Parotidectomy for bulimia: a dissenting view." Am J Otolaryngol **8**(6): 376-380.
- Satoh, M. and T. Yoshihara (2004) "Clinical and ultracytochemical investigation of sialadenosis." Acta. Otolaryngol. Suppl. **553**: 122-127.
- Schröder, U., Eckel, H.E., et al. (2000) "Wertigkeit der Feinnadelpunktionszytologie bei Neoplasien der Glandula parotis." HNO **48**: 421-429.
- Seifert, G. (1996) „Oralpathologie I." Springer **2**: 105-117.
- Steinfeld, S., E. Cogan, et al. (2001) „Abnormal distribution of aquaporin-5 water channel protein in salivary glands from Sjögren's syndrome patients." Laboratory Investigation. **81** (2): 143-148.
- Ußmüller, J. (2001) „Klinische Differenzialdiagnostik der Speicheldrüsenerkrankungen." Laryngo-Rhino-Otol 80 Suppl **1**: 61-88.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Bioin-Komplex
ADH	Antidiuretisches Hormon
AQP	Aquaporinwasserkanal
Bzw.	beziehungsweise
C	Grad Celsius
ca.	circa
CT	Computertomographie
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonuleinsäure
h	Stunde
HgCl ₂	Quecksilber
H ₂ O	Wasser
kDA	kiloDalton
m	männlich
M	Molar
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
py	pack year
w	weiblich
z.B.	zum Beispiel

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Übersicht über die Lokalisation der großen Speicheldrüsen im Kopf-Hals-Bereich (bearbeitet nach F.H. Netter, Atlas der Anatomie, 2000).	1
Abbildung 2. Klinische Manifestation der Sialadenose. (A) Sialadenosepatientin mit Schwellung der Glandulae parotidae. (B) MRT mit Darstellung einer massiven homogenen Schwellung der Glandulae parotidae.	2
Abbildung 3. Lokalisation von Aquaporinwasserkanälen in Azinuszellen. An der apikalen Plasmamembran einer Speicheldrüsenazinuszelle findet man überwiegend AQP5. AQP3 ist an der basolateralen Membranseite lokalisiert [modifiziert nach Ishikawa, 2000].	4
Abbildung 4. Markierung einzelner Azini zur Flächenbestimmung. Nach Markierung eines Azinus mit sichtbaren, randständigen Kernen wird mit Hilfe der Software MCID-Elite die Größe berechnet.	10
Abbildung 5. Avidin-Biotin-Methode (nach Noll, Urban & Fischer 2000).	12
Abbildung 6. AQP5 in Sialadenosen. Beispiel für ein deutlich positives AQP5-Signal (Markierung durch Pfeile) an der apikalen Membranseite von Azinuszellen beim Vorliegen einer Sialadenose (Orginalvergrößerung, x60).	17
Abbildung 7. AQP5 in der gesunden Glandula parotidea. Beispiel für ein schwaches AQP5-Signal im Parotisnormalgewebe. Die schwarzen Pfeile markieren AQP5-Wasserkanäle an der apikalen Seite der Azinuszellen (Orginalvergrößerung, x60).	18
Abbildung 8. Färbungen auf AQP2 in Sialadenosen zeigten erwartungsgemäß kein spezifisches Signal an der apikalen Plasmamembranseite. (Orginalvergrößerung, x60).	19
Abbildung 9. Lokalisation von AQP5 in der gesunden und erkrankten Glandula parotidea. Vergleich zwischen Sialadenose (A), Parotisnormalgewebe (B) und Parotis eines an M. Sjögren erkrankten Patienten(C). Deutlicher Unterschied in der apikalen Verteilung von AQP5.	20
Abbildung 10. Azinusgrößenunterschied (1). Ein wesentliches histopathologisches Merkmal von Sialadenosen ist der im Vergleich zu Parotisnormalgewebe vergrößerte Azinusdurchmesser. Vergleichende Darstellung der duchschnittlichen Messergebnisse des Azinusdurchmessers bei Parotisnormalgewebe (Kontrolle) und Sialadenosen und der Standardabweichung.	21
Abbildung 11. Azinusgrößenunterschied (2). Entsprechend der Vergößerung des Azinusdurchmessers bei Sialadenosen kommt es zu einer Vergrößerung der Azinusquerschnittsfläche.	22

Abbildung 12. Datenerfassungsbogen.	24
Abbildung 13. Patient 3664/03: Immunhistochemische Färbungen (A) stark positives AQP5-Signal an der apikalen Seite der Azinuszellen (B) Negativkontrolle (Orginalvergrößerung, x60).....	26
Abbildung 14. Patient 5626/00: Immunhistochemische Färbungen (A) mäßig postives AQP5-Signal an der apikalen Seite der Azinuszellen (B) Negativkontrolle (Orginalvergrößerung, x40).....	28
Abbildung 15. Patient 11952/04: Immunhistochemische Färbungen (A) deutlich postives AQP5-Signal an der apikalen Seite der Azinuszellen (B) Negativkontrolle (Orginalvergrößerung, x60).	30
Abbildung 16. Patient 12188/04: Immunhistochemische Färbungen Sialadenose (A) mäßig postives AQP5-Signal an der apikalen Seite der Azinuszellen (B) Negativkontrolle (Orginalvergrößerung, x40).	32
Abbildung 17. Patient 14326/03: Immunhistochemische Färbungen (A) deutlich postives AQP5-Signal an der apikalen Seite der Azinuszellen (B) Negativkontrolle (Orginalvergrößerung, x60).	34
Abbildung 18. Patient 5263/00: Immunhistochemische Färbungen (A) schwach positives AQP5-Signal an der apikalen Seite der Azinuszellen (B) Negativkontrolle (Orginalvergrößerung, x60).	36
Abbildung 19. Patient 5767/03: Immunhistochemische Färbungen (A) schwach positives AQP5-Signal an der apikalen Seite der Azinuszellen (B) Negativkontrolle (Orginalvergrößerung, x60).	37
Abbildung 20. Patient 10415/03: Immunhistochemische Färbungen (A) mäßig positives AQP5-Signal an der apikalen Seite der Azinuszellen (B) Negativkontrolle (Orginalvergrößerung, x60).	38
Abbildung 21. Patient 16579/00: Immunhistochemische Färbungen (A) mäßig positives AQP5-Signal an der apikalen Seite der Azinuszellen (B) Negativkontrolle (Orginalvergrößerung, x60).	39
Abbildung 22. Stundenglasmodell eines Aquaporinwasserkanals. AQP-Subunit bestehend aus sechs Transmembrandomänen, drei extrazellulären und zwei intrazellulären Schleifen (modifiziert nach Agre, 2002).	45
Abbildung 23. Kongressbeitrag auf der 76. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V., Erfurt 2005.	66

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Primärantikörper	7
Tabelle 2. Patienten der ersten Patientengruppe mit der endgültigen Hauptdiagnose „Sialadenose“.	15
Tabelle 3. Patienten mit der Nebendiagnose „Sialadenose“ bei Vorliegen einer anderen Hauptdiagnose.	16
Tabelle 4. Patienten mit histologisch gesicherter Hauptdiagnose Sialadenose. Darstellung assoziierter Erkrankungen.	24
Tabelle 5. Darstellung der zweiten Patientengruppe mit Hauptdiagnose.....	35
Tabelle 6. Aquaporinwasserkanäle. Lokalisation und mögliche Funktion von AQP [modifiziert und bearbeitet nach Matsuzaki et al., 2002].....	44

8.4 Tabellarischer Lebenslauf

"Seite 63 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung."

8.5 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren: Herr Prof. Arnold, Herr Prof. Aumüller, Herr Prof. Barth, Herr Prof. Basler, Frau Prof. Baum, Herr PD Becker, Herr Prof. Christiansen, Herr Prof. Czubayko, Herr Prof. Daut, Herr Prof. Eilers, Frau Dr. Feuser, Frau Prof. Fuchs, Herr Prof. Geus, Herr Prof. Gotzen, Herr Prof. Griss, Herr Prof. Gudermann, Herr Prof. Hasilik, Herr Prof. Hertl, Herr Prof. Hofmann, Herr Prof. Jungclas, Herr Prof. Kann, Herr Prof. Klenk, Herr Prof. Koolman, Herr Prof. Krause, Herr Prof. Krieg, Herr Prof. Kroll, Herr Prof. Lang, Herr Prof. Lill, Herr Prof. Maisch, Herr Prof. Moll, Herr Prof. Moosdorf, Herr Dr. Müller, Herr Prof. Mueller, Herr Prof. Mutters, Herr Prof. Neubauer, Herr Prof. Oertel, Herr Prof. Remschmidt, Herr Prof. Renz, Herr Prof. Röhm, Herr Prof. Rothmund, Herr Prof. Schmidt, Herr Prof. Seitz, Herr Prof. Studer, Herr Prof. Weihe, Herr Prof. Werner, Herr Prof. Wulf

8.6 Vorträge und Publikationen

1. **Borkeloh M**, Teymoortash A, Werner JA, Mandic R; “*Sialadenosis of the major salivary glands - Result of disturbances in the body’s water household ?*“; 76th Annual Meeting of the German Society for Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Erfurt, Germany, 2005 [oral presentation].
2. **Borkeloh M**, Teymoortash A, Ramaswamy A, Werner JA, Mandic R. *AQP5 as a potential key-player in sialadenosis- An Immunohistochemical study*, manuscript in preparation.
3. Mandic R, Teymoortash A, Kann PH, Werner JA. Sialadenosis of the major salivary glands in a patient with central diabetes insipidus—implications of aquaporin water channels in the pathomechanism of sialadenosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2005 Apr;113(4):205-7.
4. Kulle C, **Borkeloh M**, Dünne AA, Werner JA, Mandic R; “*Matrix metalloproteinases in head and neck cancer – an immunohistochemical study including MMPs 1 and 11*“; 4th International Symposium on Advances in Head and Neck Cancer-Basic and Clinical Research, Marburg, Germany, 2005.
5. Wennekes VE, **Borkeloh M**, Rüddel J, Werner JA, Mandic R; “*Comparison of apoptosis markers with p53 status in HNSCC cell lines*“; 4th International Symposium on Advances in Head and Neck Cancer-Basic and Clinical Research, Marburg, Germany, 2005.
6. Wennekes VE, Rüddel J, **Borkeloh M**, Werner JA, Mandic R; “*Differences in bcl-2 expression levels between HNSCC cell lines and tumor tissues*“; 7th International Conference of Anticancer Research, Korfu, Greece, 2004.



www.ent-marburg.de

Sialadenosen der Kopfspeicheldrüsen - Eine Folge von Störungen des Körper-Wasserhaushaltes ?

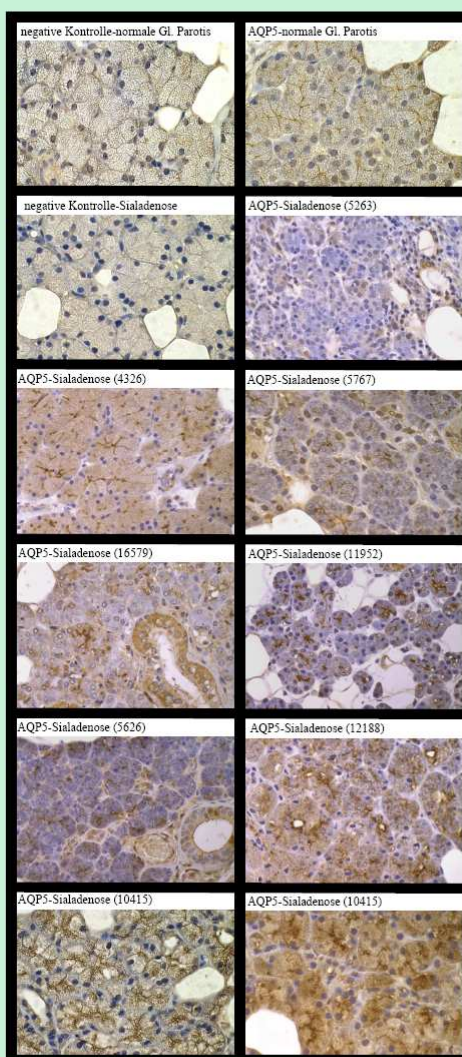
M. Borkeloh, A. Teymoortash, J.A. Werner, R. Mandic

Universitäts HNO-Klinik, Philipps Universität Marburg, Deutschhausstrasse 3, D-35037 Marburg, Germany



Einleitung. Sialadenose ist eine Erkrankung unbekannter Ätiologie und befällt vorwiegend die großen Kopfspeicheldrüsen (Donath und Seifert, 1975; Donath, 1979). Sie ist charakterisiert durch Fehlen eines der Erkrankung zugrunde liegenden, definierten pathologischen Prozesses. Unsere Gruppe berichtete kürzlich in einem Case Report über eine Patientin mit ausgeprägter Sialadenose der Gl. Parotis, welche sich bei Vorliegen eines dekompensierten Diabetes insipidus unter Einnahme von ADH entwickelte (Mandic et al., in press). ADH stimuliert sogenannte Aquaporin (AQP)-Wasserkanäle in der Niere (Borgnia et al., 1999). Es war daher von Interesse zu untersuchen, ob es Hinweise gibt auf eine Assoziation der AQP-Expression mit der Entwicklung von Sialadenose.

Material. Für die Untersuchungen wurde in Paraffin eingebettetes Glandula Parotis-Gewebe von 8 Patienten sowie 5 Kontrollpersonen, welche zwischen 2000 und 2004 an der Universitäts-HNO Klinik in Marburg behandelt wurden, herangezogen. Bei allen Patienten war eine Sialadenose der Glandula Parotis diagnostiziert worden. Bei einer Hälfte [Gruppe 1] der Patienten zeigte sich klinisch eine asymptomatische unilaterale Raumforderung im Bereich der Ohrspeicheldrüse. Bei der anderen Hälfte [Gruppe 2] der Patienten fand sich histopathologisch zwar ebenfalls eine Sialadenose, diese jedoch als Nebenbefund anderer Grunderkrankungen. **Methoden.** Gewebeschnitte wurden entparaffiniert und mittels der ABC Methode unter Standardbedingungen gefärbt. Polyklonale AQP5 oder AQP2 Primärantikörper (1:20) waren von Santa Cruz Biotechnology. Polyklonale, Immunglobuline der gleichen Spezies dienten als negative Kontrolle.



Resultate. Bei allen Patientenproben zeigte sich ein spezifisches, jedoch verschiedenes starkes, AQP5-Signal an der apikalen Membran der Azinuszellen. Eine Kontrollfärbung auf AQP2 (nierenspezifisch) war negativ in allen Proben. Das AQP5 Signal zeigte sich in der ersten Patientengruppe bei ca. 60% deutlich positiv, bei den übrigen eher mäßig oder nur in Teilabschnitten vorhanden. Innerhalb der zweiten Patientengruppe war das Signal bei ca. 75% mäßig, bei ca. 25% deutlich darstellbar. Ein spezifisches AQP5-Signal war im Normalgewebe regelmäßig schwach darstellbar.

Tabelle I [Gruppe 1] Patienten mit Sialadenose als Hauptdiagnose

Geschlecht	Assoziierte Krankheiten	Nr.
w	Kompensierte Herzinsuff. (?) Medikamente: - Novodigal - Ioprin - Nephral - ASS 100	11952/04
w	Erdbeere Struma III*	14326/03
m	Bekannte Depression Bekannte Colitis ulcerosa	12188/04
m	Epilepsieleiden Nikotinabusus Stabile Angina pectoris (Nitrospray b. Bedarf)	5626/00

Tabelle II [Gruppe 2] Hier fand sich histopathologisch zwar ebenfalls eine Sialadenose, diese jedoch als Nebenbefund einer anderen Grunderkrankung.

Geschlecht	Assoziierte Krankheiten	Hauptkrankheiten	Nr.
m	Plattenepithel-Karzinom		5263/00
m	Warthin Tumor		10415/03
m	Pleomorphes Adenom		5767/03
m	Metastasierendes Oropharynx-Karzinom		14579/01

Schlussfolgerung.

Es finden sich Hinweise auf eine Assoziation von Störungen des Körperwasserhaushaltes, repräsentiert durch eine variable Expression der AQP-Wasserkanäle, mit der Entwicklung einer Sialadenose der Gl. Parotis. Zukünftige Untersuchungen zielen darauf ab an einer größeren Anzahl von Fällen diesen Zusammenhang näher zu untersuchen und statistisch zu untermauern. Ein besseres Verständnis der Pathogenese und Pathophysiologie der Sialadenose kann zukünftig zur Entwicklung neuer Therapieansätze in der Behandlung dieser Krankheitsentität beitragen.

Literatur.

- Borgnia M, et al.: Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. Annu Rev Biochem 1999; 68: 425-458
 Donath K. [Swelling of the cheek from sialosis (author's transl)]. HNO. 1979; 27:113-8. Review. German.
 Donath K, Seifert G: Ultrastructural studies of the parotid glands in sialadenosis. Virchows Arch A Pathol Anat Histol 1975; 365: 119-135
 Mandic R, et al.: Sialadenosis of the major salivary glands in a patient with central diabetes insipidus - implications of aquaporin water channels in the pathomechanism of sialadenosis. Exp Clin Endocrinol Diab 2005, in press.

Abbildung 23. Kongressbeitrag auf der 76. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V., Erfurt 2005.

8.7 Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. J. A. Werner für die Möglichkeit diese Doktorarbeit, in der von ihm geleiteten Klinik für Hals- Nasen- und Ohrenheilkunde der Philipps-Universität Marburg durchführen zu dürfen.

Ein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Herrn PD Dr. Robert Mandic, Leiter des Forschungslabors der HNO Marburg, für die große Unterstützung und für ein jederzeit für sämtliche Fragen und Probleme offenes Ohr.

Frau R. Peldszus und Frau G. Sadowski, den beiden MTAs des HNO-Labors, danke ich für die hilfreiche Unterstützung während der Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit.

Christian und Wagma Mehlhorn sowie Gaby Tubbesing danke ich für ihre Unterstützung auf vielfältige Weise.

Meinen Eltern möchte ich in besonderer Weise danken für all ihre Liebe, ihr Interesse und ihre Unterstützung während meines Studiums.

Vor allem danke ich meiner lieben Frau Julia für ihre stetige Ermutigung und moralische Unterstützung, ohne sie gäbe es diese Arbeit sicher nicht.

Ebenfalls möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, ohne erwähnt zu werden.

8.8 Ehrenwörtliche Erklärung

"Seite 68 (Ehrenwörtliche Erklärung) enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung."